

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to a polypeptide content base material. Even if adhesion and the fecundity of a cell are high and uses a serum free medium especially in more detail, it is related with the polypeptide content base material for animal cell culture which gives a blood serum content culture medium, and the adhesion and fecundity more than equivalent.

[0002]

[Description of the Prior Art] The PURONE cutin F which is gene recombination peptide which has Arg Gly Asp arrangement. (It carries out abbreviated to PnF hereafter.) The cellular adhesiveness over the resin particulate which carried out the coat of the poly-L-lysine, [Barany by whom research presentation is made using the culture medium containing 0.5% of blood serum (J. Varani), Inman (D. R. Inman), FURIGIRU (S. E. G. Fligel), Hilli Guth (W. J. Hillegas), cytotechnology (Cytotechnology) 13-1993 years, 89 - 98 pages].

[0003]

[Problem to be solved by the invention] In this research presentation, when a 0.025microg/cm<sup>2</sup> coat carries out and it does not carry out [ 0.005microg/cm<sup>2</sup> or ] the coat of the PnF, 3 times or 5 times as much cellular adhesiveness is shown, respectively, but what has still higher adhesion and fecundity is demanded strongly. On the other hand, by the research presentation, when poly-L-lysine is carried out in a 0.5microg/cm<sup>2</sup> coat, about 41 times when not carrying out a coat as much cellular adhesiveness is shown, but there is a problem that expansion of a cell is slow, in this case. That is, the adhesive property of an animal cell and fecundity are high, the serum free medium of the adhesive property of an animal cell and fecundity is also especially high, and the purpose of this invention is to provide the base material for animal cell culture which can culture a cell efficiently.

[0004]

[Means for solving problem] By repeating research wholeheartedly and using the base material which allotted specific polypeptide, a specific functional group, and/or a specific structure to the surface, this invention person found out that early cell adhesion increased and fecundity became high, and reached this invention. Namely, the feature of the polypeptide content base material of this invention, The polypeptide (P) which has a minimum amino acid sequence showing a cell adhesion signal in [ at least one ] one molecule is included, And the 2nd class amino group (A1), the 3rd class amino group (A2), an ammonio group (A3), Let the point of having at least one structure (B) chosen from at least one functional group (A) chosen from the group which consists of a phosphatidyl group (A4) and a lysophosphatidyl group (A5) and/or sugar (B1), and a steroid ring (B-2) be a summary.

[0005]

[Mode for carrying out the invention] As a minimum amino acid sequence showing a cell adhesion signal, what can use all if it works as an adhesion signal, for example, is indicated to Nagai, Inc. publication issue "pathophysiology" Vol.9 and No.7 (1990) 527 page can be used.

[0006]The kind of cell to paste up in many among these Arg Gly Asp arrangement, LeuAsp Val arrangement, Arg Glu Asp Val arrangement (1), Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2), Pro AspSer Gly Arg arrangement (3), Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg arrangement (4), Leu Gly Thr Ile Pro Gly arrangement (5), Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile arrangement (6), Ile Lys ValAla Val arrangement (7), Leu Arg Glu arrangement, Asp Gly GluAla arrangement (8) and His Ala Val arrangement are Arg Gly Asp arrangement, Ile Lys Val Ala Val arrangement (7), and His Ala Val arrangement desirable still more preferably. These arrangement can be used combining one sort or two sorts or more. The amino acid sequence was expressed with amino acid trigraph sequence, and the array number corresponding to an amino acid sequence table was written in addition in ( ).

[0007]In polypeptide (P), said minimum amino acid sequence needs to contain in [ at least one ] one molecule. If said minimum amino acid sequence is contained, cell adhesion activity will increase and it will become possible to promote growth of an animal cell further, where an original function is maintained. On the other hand, when said minimum amino acid sequence does not contain, cellular adhesiveness falls. As a result, especially, growth of a cell becomes insufficient when using a serum free medium.

[0008]Among [ from a viewpoint of cell adhesion and fecundity ] one molecule, 3-50 pieces are desirable still more preferred, and the number of 5-40 content in one molecule (P) of this minimum amino acid sequence is 10-30 especially preferably. Cell adhesion activity increases further that content is this range, and it is to promote growth of an animal cell, where an original function is maintained in the tendency which becomes easy easily.

[0009]5,000 or more are 50,000 or more especially preferably 10,000 or more desirable still more preferably at the point that the number average molecular weight (it carries out abbreviated to Mn hereafter) of polypeptide (P) has the low toxicity over a cell, and adhesion performance is high. 5,000,000 or less are 500,000 or less especially preferably 1,000,000 or less desirable still more preferably. (Mn) of polypeptide (P) is the SDS-PAGE method (Na dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), develops (P) underwater and is calculated by comparing migration distance with a standard substance.

[0010]Polypeptide (P) in addition to the minimum amino acid sequence showing a cell adhesion signal, The thermal stability of (P) an increasing amino acid sequence (9), for example, the GlyAla Gly Ala Gly Ser arrangement of silk fibroin origin, at least two pieces, Having in a molecule is preferred, it is still more preferred to have these five or more amino acid sequences, and especially the thing for which it has 3-30 pieces is preferred.

[0011]The polypeptide which has  $(\text{Gly Ala Gly Ala Gly Ser})_9$  arrangement (10) and Arg Gly Asp arrangement as polypeptide (P), for example,  $(\text{Gly Ala Gly Ala Gly Ser})$  The polypeptide which has  $_9$  arrangement (10) and Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2),  $(\text{Gly Ala Pro})_{(\text{Gly Pro Pro})_4}$  The polypeptide which has  $_2$  arrangement (11) and Arg GlyAsp arrangement,  $(\text{Gly Ala Pro})_{(\text{Gly Pro Pro})_4}$  The polypeptide which has  $_2$  arrangement (11) and Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2), And  $(\text{Gly Ala Gly Ala Gly Ser})$  the polypeptide (JP,H3-502935,A) etc. which have  $_9$  arrangement (10) and Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) are mentioned.

[0012]As what can be obtained from a commercial scene as polypeptide (P), For example, PURONE cutin F by Sanyo Chemical Industries, Ltd. (it is manufactured with gene recombination

Escherichia coli, and) (Mn) about 110,000 polypeptide which has respectively Arg Gly Asp arrangement and about 13 <sup>(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)<sub>3</sub></sup> arrangement (10) in one molecule, The PURONE cutin F plus (what the PURONE cutin F was made to react to JIMERU aminoethyl chloride, and was made into water solubility), The PURONE cutin L ((Mn) about 90,000 polypeptide which is manufactured with gene recombination Escherichia coli and has respectively Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) and about seven <sup>(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)<sub>3</sub></sup> arrangement (10) in one molecule) is mentioned.

[0013].CS1 signal, the cell adhesion domain Typelll, and the heparin bonding domain II which are TAKARA SHUZO CO., LTD. make RetroNectin(recombinant Homo sapiens fibronectin CH-296) [Homo sapiens fibronectin cell adhesion signals. (Mn) about 60,000 polypeptide] which it has one [ at a time ], and the RGDS-ProteinA ((Mn) about 30,000 polypeptide which inserted Arg Gly Asp arrangement in Protein A (IgG connection domain)) are usable as polypeptide (P).

[0014]The manufacturing method in particular of polypeptide (P) is not restricted, but can be manufactured like the method of the conventional known which compounds peptide, For example, it is compoundable with organic synthesis methods (a solid-phase-synthesis method, liquid phase synthesis method, etc.), a biochemical synthetic method [transgenics microorganisms (yeast, bacteria, Escherichia coli, etc.)], etc.

[0015]About an organic synthesis method, the method etc. which are indicated to the 641-694th pages (Showa 62(1987) May 20; Tokyo Kagaku Dojin Issue) of Japanese biochemistry society editing "chemistry (below) of New Biochemistry Experiment Lectures 2 and protein" are used, for example.

[0016]About a biochemical synthetic method, the method etc. which are indicated to JP,H3-502935,A are used, for example. It is a point which can compound the polypeptide (P) of the amount of polymers easily, and the biochemical synthetic method by a transgenics microorganism is the method of compounding using transgenics Escherichia coli preferably desirable especially.

[0017]Polypeptide (P) is that the thing [ that the part exists in the base material surface altogether ] is desirable still more preferred, and all of (P) exist in the base material surface. A base material surface means the field where culture medium may touch, when a base material is vessel shape and culture medium is put in in a container, and when a base material is particle state, and a base material is put in culture medium, it means the field where culture medium can contact.

[0018]As a quantity (mg/cm<sup>2</sup>) of the polypeptide (P) of a base material surface, 0.1 or more surface area [ of 1 cm ]<sup>2</sup> hits of the viewpoint of adhesion and the fecundity of a cell to a base material are 0.3 or more especially preferably 0.2 or more desirable still more preferably. From a viewpoint of economical efficiency, 100 or less are ten or less especially preferably 50 or less desirable still more preferably. The quantity of the polypeptide (P) of a base material surface can be measured with the usual amount measuring reagents of proteins (for example, BCA protein reagent by a pierced earring chemical company, etc.). When the base material of the surface area of a base material is vessel shape, It is computable from the form of this base material surface, and when a base material is a spherical particle, Can calculate from the mean particle diameter and density, and at the time of [particle diameter;2r (micrometer) and density;d (g/cm<sup>3</sup>) surface area (cm<sup>2</sup>/g),  $4\pi r^2 / (4/3\pi r^3 \cdot d) = 3/(rd)$  In the case of the particle state of] and porosity, it can do in fixed quantity with a BET value specific surface area plan (for example, volume [ trade

name:QUANTASORB, the Yuasa Ionics make, and / measurement gas:helium/Kr=99.9/0.1 ] %, measuring gas: nitrogen).

[0019]As the 2nd class amino group (A1), the basis etc. which are expressed with an aliphatic series amino group, an aromatic amino group, the basis expressed with  $\text{-NHCH}_2\text{-}$ , and  $\text{-C(=NH)-}$  can be used. these carbon numbers — 1-16 — desirable — further — desirable — 1-12 — it is 1-6 especially preferably.

[0020]As an aliphatic series amino group, a methylamino group, an ethylamino group, a propylamino group, a butylamino group, a cyclohexylamino group, a 2-ethylhexyl amino group, a dodecylamino group, a hexadecylamino group, a benzylamino group, 2-phenyl ethylamino group, etc. are mentioned.

[0021]As an aromatic amino group, a phenylamino group (anilino group), 4-methylphenylamino group (4-methylanilino group), a naphthyl amino group, etc. are mentioned. The basis expressed with an aliphatic series amino group, the basis expressed with  $\text{-NHCH}_2\text{-}$ , and  $\text{-C(=NH)-}$  among these is preferred, It is a basis expressed with the basis expressed with a methylamino group, an ethylamino group, a propylamino group, the basis expressed with  $\text{-NHCH}_2\text{-}$ , and  $\text{-C(=NH)-}$  still more preferably, the basis especially expressed with  $\text{-NHCH}_2\text{-}$  preferably, and  $\text{-C(=NH)-}$ .

[0022]As the 3rd class amino group (A2), the basis etc. which are expressed with an aliphatic series amino group, an aromatic amino group,  $\text{-N(CH}_2\text{-OH)CH}_2\text{-}$ , or  $\text{-N(CH}_3\text{)CH}_2\text{-}$  can be used. these carbon numbers — 2-32 — desirable — further — desirable — 2-24 — it is 2-12 especially preferably.

[0023]As an aliphatic series amino group, a dimethylamino group, a diethylamino group, a methylpropyl amino group, a diisopropylamino group, a dibutylamino group, a dicyclohexylamino group, a didodecylamino group, a dihexadecylamino group, a dibenzylamino group, etc. are mentioned.

[0024]A diphenylamino group, a dinaphthylamino group, etc. are mentioned as an aromatic amino group. The basis expressed with an aliphatic series amino group,  $\text{-N(CH}_2\text{-OH)CH}_2\text{-}$ , or  $\text{-N(CH}_3\text{)CH}_2\text{-}$  desirable still more preferably among these, The basis expressed with a dimethylamino group, a diethylamino group, a dipropylamino group and  $\text{-N(CH}_2\text{-OH)CH}_2\text{-}$ , or  $\text{-N(CH}_3\text{)CH}_2\text{-}$ , It is a basis especially expressed with a dimethylamino group, a diethylamino group and  $\text{-N(CH}_2\text{-OH)CH}_2\text{-}$ , or  $\text{-N(CH}_3\text{)CH}_2\text{-}$  preferably.

[0025]as an ammonio group (A3) — an aliphatic series ammonio group, an aromatic ammonio group, and  $\text{>C=N}^+\text{=C} <$  — the basis etc. which are expressed with basis and  $\text{-CH}_2\text{N(CH}_3\text{)}_2\text{CH}_2\text{-}$  expressed can be used. these carbon numbers — 1-48 — desirable — further — desirable — 2-36 — it is 2-18 especially preferably.

[0026]As an aliphatic series ammonio group, a methylammonio group, an ethylammonio group, A propylammonio group, a butylammonio group, a cyclohexylammonio group, A 2-ethylhexyl ammonio group, a dodecylammonio group, a hexadecylammonio group, A benzylammonio group, 2-phenylethyl ammonio group, a dimethylammonio group, A diethylammonio group, a methylpropyl ammonio group, a diisopropylammonio group, A dibutylammonio group, a dicyclohexyl ammonio group, a didodecylammonio group, A dihexadecylammonio group, a dibenzylammonio group, a trimethylammonio group, A triethylammonio group, a methyldi ethylammonio group, a methyldi

isopropylammonio group, A methyl di butylammonio group, a methyl di cyclohexylammonio group, a methyl di dodecylammonio group, a trihexadecyl ammonio group, a tribenzyl ammonio group, etc. are mentioned.

[0027]As an aromatic ammonio group, a benzylammonio group, a methylphenyl ammonio group, a methyl naphthyl ammonio group, a methyl di phenylamino group, a methyl di naphthylamino group, a tribenzyl ammonio group, etc. are mentioned.

[0028]among these — an aliphatic series ammonio group and  $>C=N^+=C <$  — a basis expressed with basis and  $-CH_2N(CH_3)_2CH_2-$  expressed desirable still more preferably, A methylammonio group, an ethylammonio group, a propylammonio group, A butylammonio group, a trimethylammonio group, a triethylammonio group, A methyl di ethylammonio group, a methyl di isopropylammonio group, a methyl di butylammonio group and  $>C=N^+=C <$  — a basis expressed with basis and  $-CH_2N(CH_3)_2CH_2-$  expressed — preferably especially, a methylammonio group, an ethylammonio group, a trimethylammonio group, a triethylammonio group, a methyl di ethylammonio group, and  $>C=N^+=C <$  — it is a basis expressed with basis and  $-CH_2N(CH_3)_2CH_2-$  expressed.

[0029]As a phosphatidyl group (A4), the basis (a substitution phosphatidyl group) expressed with basis (unreplaced phosphatidyl group) or  $R^1OCH_2CH(OR^2)CH_2OP(=O)(O^-)-$  expressed with  $HOCH_2CH(OH)CH_2OP(=O)(O^-)-$   $R^1$  and  $R^2$  can use that it is the acyl group of saturation or an unsaturation, alkyl group, or alkenyl group which is the same or is different etc. the carbon number of an acyl group, an alkyl group, or an alkenyl group — 1-22 — desirable — further — desirable — 2-18 — it is 12-18 especially preferably.

[0030]as an acyl group — a saturated acyl group (an acetyl group, a butanoyl group, and a hexanoyl group.) Unsaturation acyl groups (the Reno Leo yl groups, an octadecyl enoyl group, the Oreo yl groups, etc.), such as a decanoyl group, a lauroyl group, a myristoyl group, a palmitoyl group, a stearoyl group, and an arachidonoyl group, etc. are mentioned.

[0031]As an alkyl group, a methyl group, a hexadecyl group, a butyl group, a HEKIKIRU group, a decyl group, a lauryl group, a myristyl group, a palmityl group, a stearyl group, an arak Doyle group, etc. are mentioned.

[0032]As an alkenyl group, a linoleyl group, an octadecyl dienyl group, the Oreo yl groups, etc. are mentioned. an unreplaced phosphatidyl group and a substitution phosphatidyl group ( $R^1$  and  $R^2$  are acyl groups) are [ among these ] preferred, further — desirable — an unreplaced phosphatidyl group and a substitution phosphatidyl group ( $R^1$  and  $R^2$  are unsaturation acyl groups) — it is a substitution phosphatidyl group ( $R^1$  and  $R^2$  are same unsaturation acyl groups) phosphatidyl group especially preferably.

[0033]As a lysophosphatidyl group (A5), the basis ( $R^3$  is an acyl group of saturation or an unsaturation) etc. which are expressed with  $R^3OCH_2CH(OH)CH_2OP(=O)(O^-)-$  can be used. the carbon number of an acyl group — 1-22 — desirable — further — desirable — 2-18 — it is 12-18 especially preferably.

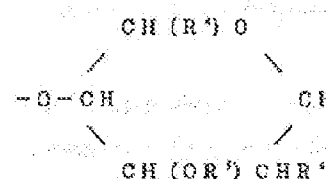
[0034]As an acyl group, the same thing as the case of a phosphatidyl group (A4) can be used. The substitution lysophosphatidyl group whose  $R^3$  is an unsaturation acyl group is [ among these ] preferred.

[0035]The structure etc. which can use the structure of having one or more bases expressed with

the following chemical formula (\*\* 1) etc., as sugar (B1), for example, the sugar of nature or composition contains are used.

[0036]

[Chemical formula 1]



[0037]  $\text{R}^4$  -H,  $-\text{COO}^-$ , and  $-\text{CH}_2\text{OH}$  and  $-\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ . - Express either  $\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$  or  $-\text{CH}_3$ , and  $\text{R}^5$ , -Expressing either H and  $-\text{COCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$  or  $-\text{CH}(\text{CH}_3) \text{COO}^-$ ,  $\text{R}^6$  expresses either  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCOCH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCOCH}_3$ , and  $-\text{NHCOCH}_2\text{OH}$  or  $-\text{F}$ .

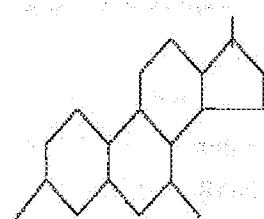
[0038] as the sugar of nature or composition — monosaccharide (galactose, glucose, and mannose.) Fucose, glucosamine, galactosamine, N-acetyl galactosamine, N-methylglucosamine, N-acetyl new lamin acid, arabinose, Deoxyglucose, deoxy fluoroglucose, a ribose, deoxyribose, Erythrose, fructose, inositol, lyxose, a MADOU sirloin, muramic acid, deoxy MANOSU, a sorbose, xylose, and doria — cetyl glucal etc., polysaccharide (cellobiose, JIFURUKUTOSU, KOJIBIOSU, and lactose.) Lactulose, maltitol, malt sugar, trehalose, galla KUTOSHI lactose, Glucosyl sucrose, isomalt oligosaccharide, malto oligosaccharide, TEHAROSAMIN, a panose, KISHIROORIGO saccharose FUFURUKUTO oligosaccharide, all [ PARAMI / nistose, a SUTAKI sirloin chito-oligosaccharide, chitosan oligosaccharide, a mucopolysaccharide arginine acid curdlan, dextran, levan, and ], polydextrose, pullulan, starch, cyclodextrin, etc. — etc. — it is mentioned.

[0039] Among these Galactose, glucose, mannose, fucose, Glucosamine, galactosamine, N-methylglucosamine, N-acetyl galactosamine, and N-acetyl new lamin acid are preferred, They are galactose, glucose, mannose, fucose, N-acetyl galactosamine, and N-acetyl new lamin acid still more preferably.

[0040] The steroid ring etc. which can use the ring structure etc. which are expressed with the following chemical formula (\*\* 2) as a steroid ring (B-2), for example, are contained in the bile acid or sterol of nature or composition are used.

[0041]

[Chemical formula 2]



[0042] As bile acid of nature or composition, all [ KENOJI ], cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, Glico lithocholic acid, RISOKORU acid, squalene, taurocholic acid, etc. are mentioned.

[0043] As sterol of nature or composition, BURASHIKA sterol, campesterol, cholesterol, ergosterol,

fucosterol, lanosterol, a sitosterol, stigmasterol, etc. are mentioned. The steroid ring contained in bile acid is a steroid ring contained in cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, Glicolichoic acid, or RISOKORU acid desirable still more preferably among these.

[0044]The thing [ that the part exists in the base material surface altogether ] of a functional group (A) and structure (B) is preferred, and it is still more preferred that all exist in the base material surface. The functional group (A) of a base material surface and the content (piece/cm<sup>2</sup>) of structure (B), surface-area [ of 1 cm ] <sup>2 of a base material</sup> hitting from a viewpoint of the initial adhesion improved effect of a cell, or a fecundity improved effect —  $1 \times 10^{13} - 1 \times 10^{20}$  — desirable — further — desirable —  $1 \times 10^{15} - 1 \times 10^{19}$  — it is  $1 \times 10^{15} - 1 \times 10^{17}$  especially preferably.

[0045]The functional group (A) of a base material surface and the content of structure (B) are quantified by the kind of a functional group (A) and structure (B) by the following methods. In the case of the 2nd class amino group (A1), the 3rd class amino group (A2), and an ammonio group (A3), it can ask by measuring amine value with potentiometric titration using the usual amine titration reagents (for example, a hydrochloric acid aqueous solution or a silver nitrate aqueous solution etc.).

[0046]In the case of a phosphatidyl group (A4), a lysophosphatidyl group (A5), sugar (B1), and a steroid ring (B-2), it can ask with enzyme assay. That is, in the case of a phosphatidyl group (A4) and a lysophosphatidyl group (A5), it can ask by using the Kainos Laboratories phospholipid measurement kit "Aqua auto Kainos Laboratories PL reagent" etc., for example. In the case of sugar (B1), it can ask by using "the object for F-kit sugar" by the Roche diagnostics company. In the case of a steroid ring (B-2), it can ask by using "the object for F-kit steroid" by the Roche diagnostics company etc., for example.

[0047]As a base material used for manufacture of the polypeptide content base material of this invention, that etc. by which normal use is carried out can be used as a base material for cell cultures, for example, a petri dish, a plate, a flask, a roller bottle, a micro carrier bead, a hollow fiber, etc. are mentioned. As a raw material of these base materials, an inorganic substance (glass, Ceramics Sub-Division, hydroxyapatite, etc.), and organic matter {synthetic macromolecule [polyvinyl resin (polystyrene and polymethylmethacrylate.) A polyvinyl formal, polymethyl menthene, polyvinyl alcohol, Polyester [ such as polyacrylamide, polyethylene, and polyp ROPIRE, ], polycarbonate, urethane resin, and epoxy resin], naturally-occurring polymers (a PORIDE kis run, cellulose, collagen, gelatin, etc.)}, etc. are mentioned.

[0048]As a petri dish, the thing of 5-500 cm<sup>2</sup> / individual is mentioned for the surface area (culture face product) of a base material. As a plate, the thing of 2 - 384 hole / plate is mentioned. If spread with a flask, the surface area (culture face product) of a base material is mentioned for T-flask, a spinner flask, etc. of 10-500 cm<sup>2</sup> / individual. As a roller bottle, that etc. whose capacity is 0.1 - 10L / individual are mentioned. As a micro carrier bead, the thing of surface area (culture face product): 100-100,000-cm<sup>2</sup>/g of particle diameter: 20-500 micrometer, density: 1.0-1.1g/cm<sup>3</sup>, and a base material is mentioned. As a hollow fiber, a thing 10-500 micrometers in inside diameter etc. are mentioned.

[0049]A micro carrier bead is preferred at the point that a high-density cell is efficiently obtained among these base materials. 30 or more are 50 or more especially preferably 40 or more desirable

still more preferably at the point of the surface area per unit weight being large, and being easy to paste up a cell as particle diameter (micrometer). 300 or less are 100 or less especially preferably 200 or less desirable still more preferably. 1.0 or more are 1.02 or more especially preferably 1.01 or more desirable still more preferably at the point of being easy to sediment promptly if it floats by loose churning as density ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) and churning is stopped. 1.1 or less are 1.04 or less especially preferably 1.05 or less desirable still more preferably.

[0050] Compatibility with a cell in that it is high and excels in heat resistance Styrene and polyfunctional monomer [divinylbenzene, The thing containing the synthetic macromolecule which becomes considering], such as ethylene glycol di(metha)acrylate, trivinylbenzene, and trimethylolpropane bird (meta) acrylate, as an essential constituent monomer is preferred. Based on the weight of a base material, 0.1 or more are desirable still more preferred, and the content (weight %) of polyfunctional monomer in this case is one or more especially preferably 0.5 or more. 40 or less are ten or less especially preferably 20 or less desirable still more preferably.

[0051] The polypeptide content base material of this invention by allotting polypeptide (P) to the base material which has a functional group (A) and/or structure (B) (for example, coating). It can manufacture arranging the compound which has a functional group (A) and/or structure (B), after allotting (P) to a base material, or by allotting simultaneously the compound which has a functional group (A) and/or structure (B) in a base material (for example, coating), and (P).

[0052] After producing beforehand the solution which melted polypeptide (P) in the solvent, or the distributed dispersion liquid as a method of allotting polypeptide (P) to a base material (surface), for example and contacting a base material to this, the method of drying, etc. are applicable.

[0053] Although there is no restriction in particular as a solvent used in order to produce the solution or dispersion liquid of polypeptide (P), solution, water, etc. containing mineral salt, organic acid salt, amino acid, a vitamin, alcohol, lipid and sugar, acid, and/or a base can be used.

[0054] As mineral salt, a halogenated metal salt, sulfuric acid metal salt, phosphoric acid metal salt, nitric acid metal salt, Can use carbonic acid metal salt, fault halogen acid metal, etc., and For example, sodium chloride, A calcium chloride, potassium chloride, a lithium chloride, a sodium bromide, a lithium bromide, Sodium sulfate, magnesium sulfate, copper sulfate, ferrous sulfate, sodium phosphate, dibasic sodium phosphate, potassium phosphate, potassium hydrogenphosphate, iron nitrate, sodium carbonate, sodium perchlorate, lithium perchlorate, etc. are mentioned. As organic acid salt, the organic acid metal salt of the carbon numbers 1-4, etc. can be used, for example, sodium formate, sodium acetate, lithium acetate, sodium tartrate, etc. are mentioned.

[0055] As amino acid, can use natural amino acid etc. and For example, arginine, Histidine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, an alanine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, proline, serine, a glycine, etc. are mentioned. As a vitamin, Kolin, inositol, nicotinamide, glutamine, vitamin A, and vitamin B<sub>12</sub> etc. are mentioned, for example. As alcohol, alcohol of the carbon numbers 1-4, etc. can be used, for example, methanol, ethanol, isopropyl alcohol, butanol, etc. are mentioned.

[0056] As lipid and sugar, natural sugar etc. can be used, for example, lipid, a monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide, aminosugar, acid sugar, etc. are mentioned. As acid, inorganic acid, the organic acid of the carbon numbers 1-6, etc. can be used, for example, chloride, nitric acid,



sulfuric acid, phosphoric acid, acetic acid, formic acid, tartaric acid, malic acid, methanesulfonic acid, phenol, catechol, etc. are mentioned. As a base, an inorganic base, the organic base of the carbon numbers 2-6, etc. can be used, for example, sodium hydroxide, a potassium hydrate, sodium bicarbonate, ammonia, monoethanolamine, triethanolamine, triethylamine, etc. are mentioned.

[0057]As water, distilled water, ion exchange water, tap water, ionic exchange distilled water, etc. are mentioned. They are solution in which the solution and water containing mineral salt, acid, and/or a base contain mineral salt desirable still more preferably in these solvents and water, and solution which contains mineral salt preferably especially. As such content (weight %), 0.1 or more are desirable still more preferred based on the weight of solution or dispersion liquid, and it is one or more. 50 or less are 30 or less desirable still more preferably.

[0058]More than 0.01micro[ per ml of solvent ] g is desirable still more preferred, and the concentration of (P) in the solution of polypeptide (P) or dispersion liquid of more than 0.1microg is more than 1microg especially preferably. 100 mg or less of 10 mg or less is 1 mg or less especially preferably desirable still more preferably. Any, such as the method of immersing a base material in the method, the solution, or dispersion liquid which sprinkles a solution or dispersion liquid over a base material, may be sufficient as the contact with the solution of peptide (P) or dispersion liquid, and a base material.

[0059]Although it changes as contact time also with base materials to be used, 30 seconds or more are 3 minutes or more especially preferably 1 minute or more desirable still more preferably. 48 or less hours is 12 or less hours especially preferably desirable still more preferably for 24 or less hours. It can carry out by there being no restriction in particular also about the conditions of the desiccation performed if needed, and being able to apply the usual method, for example, drying for 1 to 100 hours using a fair wind dryer, a reduced-pressure-drying machine, etc. if needed under 0-200 \*\*, 0.001 Pa -- the pressure of atmospheric pressure.

[0060]The front stirrup of the desiccation performed if needed can also be washed by the usual method with the solution or water which contains mineral salt later. Sterilization treatment may be performed after contact if needed. A sterilizing method does not have restriction in particular, for example, radappertization, ethylene oxide gas sterilization, autoclave sterilization, hot-air sterilization, etc. are mentioned.

[0061]As a method of allotting a base material, a functional group (A) and/or structure (B), \*\* In the case of the base material which uses polyvinyl resin as the main ingredients, the monomer which has (A) and/or (B). How to carry out the covalent bond of the reactive compound which has the method of carrying out copolymerization when creating the base material which uses polyvinyl resin as the main ingredients, \*\* (A), and/or (B) to a base material, \*\*(A) And/or, when producing a base material for the compound which has the method of contacting the compound which has (B) on the surface of a base material, \*\* (A), and/or (B), the method of mixing into the material which constitutes a base material, etc. are mentioned.

[0062]Even if it is carrying out the chemical bond of (A) and/or the (B) to a base material surface or polypeptide (P), physical adsorption of them may be carried out to a base material surface or (P) as a compound which has (A) and/or (B). When carrying out a chemical bond by the 3 or 4th either 1 of sugar or place when sugar's carries out a chemical bond, and steroid carry out a chemical

bond, it can be made to join together by the 7 or 14th either 3 of steroid or place.

[0063]\*\* In a method, as a monomer which has a functional group (A) and/or structure (B), A monomer (ma1) which has the 2nd class amino group (A1), a monomer which has the 3rd class amino group (A2) (ma2), A monomer (ma3) which has an ammonio group (A3), a monomer which has a phosphatidyl group (A4) (ma4), A monomer (ma5) which has a lysophosphatidyl group (A5), a monomer (mb1) which has sugar (B1), monomers (mb2) which have a steroid ring (B-2), two or more sorts of these mixtures, etc. can be used.

[0064]As a monomer (ma1) which has the 2nd class amino group (A1), 2nd class amino group content (meta) acrylate [N-methylamino ethyl (meta) acrylate, N-ethylaminopropyl (meta) acrylate, N-propyl aminoethyl (meta) acrylate, ], such as N-benzyl aminoethyl (meta) acrylate and piperidino ethyl (meta) acrylate, 2nd class amino group content (meta) acrylamide [N-methylamino ethyl(meta) acrylamide, ], such as N-ethylaminopropyl (meta) acrylamide, N-propyl aminoethyl (meta) acrylamide, and N-benzyl aminoethyl (meta) acrylamide, the 2nd class amino group content aromatic vinyl hydrocarbon (N-methylamino styrene.) The 2nd class amino group content allyl ether (N-methylamino ethyl allyl ether, N-ethylamino ethyl allyl ether, etc.), such as N-propylamino styrene and N-benzylamino styrene, etc. are mentioned.

[0065]As a monomer (ma2) which has the 3rd class amino group (A2), 3rd class amino group content (meta) acrylate [N and N-dimethylaminoethyl (meta) acrylate, N,N-diethylamino propyl (meta) acrylate, N,N-dipropyl aminoethyl (meta) acrylate, ], such as N-benzyl-N-methylamino ethyl (meta) acrylate, morpholino ethyl (meta) acrylate, and N-methyl PIPECHIJINO ethyl (meta) acrylate, 3rd class amino group content (meta) acrylamide [N,N-dimethylaminoethyl (meta) acrylamide, N,N-diethylamino propyl(meta) acrylamide, N,N-dipropyl aminoethyl (meta) acrylamide, ] and the 3rd class amino group content aromatic vinyl hydrocarbon (N,N-dimethylamino styrene.), such as N-benzyl-N-methylamino ethyl(meta-) acrylamide, morpholino ethyl(meta-) acrylamide, and N-methyl PIPECHIJINO ethyl(meta-) acrylamide The 3rd class amino group content allyl ether (N,N-dimethylaminoethyl allyl ether, N,N-diethylaminoethyl allyl ether, etc.), such as N,N-dipropylamino styrene and N-benzyl-N-methylamino styrene, etc. are mentioned.

[0066]As a monomer (ma3) which has an ammonio group (A3), Ammonio group content (meta) acrylate [(meta) acryloyloxyethyl ammonium chloride, Methyl (meta) acryloyloxyethyl ammonium chloride, Dimethyl (meta) acryloyloxyethyl ammonium chloride, ], such as trimethyl (meta) acryloyloxyethyl ammonium chloride and diethylmethyl (meta) acryloyloxyethyl ammonium chloride, Ammonio group content (meta) acrylamide [(meta) acryloylamino ethylammonium chloride, Methyl (meta) acryloylamino ethylammonium chloride, Dimethyl (meta) acryloylamino ethylammonium chloride, Trimethyl (meta) acryloylamino ethylammonium chloride and diethyl ], such as methyl (meta) acryloylamino ethylammonium chloride, Ammonio group content aromatic vinyl hydrocarbon (trimethyl vinylphenyl ammonium chloride etc.), ammonio group content allyl ether (triethyl allyloxy ethylammonium chloride etc.), etc. are mentioned.

[0067]As a monomer (ma4) which has a phosphatidyl group (A4), Phosphatidyl group content (meta) acrylate [phosphatidyl ethyl (meta) acrylate, ], such as dipalmitoyl phosphatidyl ethyl (meta) acrylate and JIARAKIDO oil phosphatidyl propyl (meta) acrylate, Phosphatidyl group content

(meta) acrylamide [phosphatidyl ethyl (meta) acrylate, ], such as dipalmitoyl phosphatidyl ethyl (meta) acrylate and JIARAKIDO noil phosphatidyl propyl (meta) acrylate, Phosphatidyl group content aromatic vinyl hydrocarbon (dipalmitoyl phosphatidyl styrene etc.), phosphatidyl group content allyl ether (dipalmitoyl phosphatidyl ECHIRUARIRU ether etc.), etc. are mentioned.

[0068]As a monomer (ma4) which has a lysophosphatidyl group (A5), Lysophosphatidyl group content (meta) acrylate [PAL MITOIRUJIZO phosphatidyl ethyl (meta) acrylate, arachidonoyl lysophosphatidyl propyl (meta) acrylate], etc., Lysophosphatidyl group content (meta) acrylamide [palmitoyl lysophosphatidyl ethyl (meta) acrylate, arachidonoyl lysophosphatidyl propyl (meta) acrylate], etc., Lysophosphatidyl group content aromatic vinyl hydrocarbon (palmitoyl lysophosphatidyl styrene etc.), lysophosphatidyl group content allyl ether (palmitoyl lysophosphatidyl ECHIRUARIRU ether etc.), etc. are mentioned. as a monomer (mb1) which has sugar (B1), sugar content aromatic vinyl hydrocarbon (N-p-vinylbenzyl RAKUTONO amide etc.), sugar content (meta-) acrylate [glucose 6-(meta-) acrylate] etc., etc. are mentioned.

[0069]As a monomer (mb2) which has a steroid ring (B-2), steroid ring content (meta) acrylate [cholesterol (meta) acrylate, ergosterol (meta) acrylate], etc. is mentioned. These are blended with the monomer which constitutes polyvinyl resin as a method of carrying out copolymerization using these monomers, and the method of carrying out copolymerization by the usual methods (bulk polymerization, suspension polymerization, etc.), etc. are mentioned. Based on the full weight of a constituent monomer, 0.001 or more are desirable still more preferred, and the content (weight %) of these monomers when carrying out copolymerization is 0.1 or more. 30 or less are 20 or less desirable still more preferably.

[0070]\*\* In a method, as a reactive compound which has a functional group (A) and/or structure (B), The reactive compound which has the 2nd class amino group (A1), the reactive compound which has the 3rd class amino group (A2), The reactive compound which has an ammonio group (A3), the reactive compound which has a phosphatidyl group (A4), The reactive compound which has a lysophosphatidyl group (A5), the reactive compound which has sugar (B1), the reactive compounds which have a steroid ring (B-2), two or more sorts of these mixtures, etc. can be used. As a reactive compound which has the 2nd class amino group (A1), The 2nd class amino group content halogen hydrocarbon of the carbon numbers 3-5 besides the monomer which has above (A1) (methylamino ethyl chloride, methylaminopropyl chloride, etc.), The 2nd class amino group content epoxide (methylaminopropyl epoxide, methylamino butylepoxide, methylamino ethyl glycidyl ether, etc.) of the carbon numbers 4-8, etc. are mentioned.

[0071]As a reactive compound which has the 3rd class amino group (A2), The 3rd class amino group content halogen hydrocarbon of the carbon numbers 4-6 besides the monomer which has above (A2) (dimethylamino ethyl chloride, diethylamino ethyl chloride, etc.), The 3rd class amino group content epoxide (dimethylaminopropylepoxide, dimethylaminoethyl glycidyl ether, etc.) of the carbon numbers 5-8, etc. are mentioned.

[0072]As a reactive compound which has an ammonio group (A3), Ammonio group content halogen hydrocarbon (trimethyl chloro ethylammonium chloride etc.) of the carbon numbers 5-8 besides the monomer which has above-mentioned (A3), ammonio group content epoxide (trimethyl glycidyl ethylammonium chloride etc.) of the carbon numbers 6-10, etc. are mentioned.

[0073]As a reactive compound which has a phosphatidyl group (A4), Phosphatidyl group content halogen hydrocarbon of the carbon numbers 2-6 besides the monomer which has above-mentioned (A4) (phosphatidyl ethyl chloride, dimyristoyl phosphatidyl ethyl chloride, etc.), Phosphatidyl group content epoxide (phosphatidyl ethyl glycidyl ether, dimyristoyl phosphatidyl ethyl glycidyl ether, etc.) of the carbon numbers 3-8, etc. are mentioned.

[0074]As a reactive compound which has a lysophosphatidyl group (A5), Lysophosphatidyl group content halogen hydrocarbon of the carbon numbers 2-6 besides the monomer which has above-mentioned (A5) (myristoyl lysophosphatidyl ethyl chloride etc.), Lysophosphatidyl group content epoxide (myristoyl lysophosphatidyl ethyl glycidyl ether etc.) of the carbon numbers 3-8, etc. are mentioned.

[0075]As a reactive compound which has sugar (B1), sugar content halogen hydrocarbon (glucose 6-ethyl chloride etc.) of the carbon numbers 6-18 besides the monomer which has above (B1), sugar content epoxide (glucose 6-glycidyl ether etc.) of the carbon numbers 6-18, etc. are mentioned.

[0076]As a reactive compound which has a steroid ring (B-2), The steroid ring content halogenide of the carbon numbers 17-32 besides the monomer which has above-mentioned (B-2), steroid ring content epoxide (chloroethylcholesterol etc.) (glycidyl cholesterol etc.) of the carbon numbers 17-32, etc. are mentioned.

[0077]When carrying out the covalent bond of base materials and these reactive compounds and using the above-mentioned monomer, The method of making these reactive compounds (good also as aqueous suspension) reacting to a base material at 50-120 °C under a nitrogen atmosphere for 1 to 48 hours with peroxide (sodium perchlorate, dibutyl peroxide, JIKUMIRU peroxide, cumene hydro-peroxide, etc.) may be applied.

[0078]When using halogen hydrocarbon or epoxide, with bases (sodium hydroxide, potassium hydrate, triethylamine, 1, and 8-diazabicyclo [5, 4, 0] undecene 7 (registered trademark: DBU) etc.). The method etc. to which base materials, these halogen hydrocarbon, or epoxide (good also as aqueous suspension) is made to react at 20-90 °C for 1 to 48 hours may be applied. The amount of the reactive compound used (g/cm<sup>2</sup>) surface-area [ of 1 cm ] <sup>2 of a base material</sup> Hits, and more than 1x10<sup>-8</sup> is desirable still more preferred, and it is more than 1x10<sup>-62</sup>. One or less is below 1x10<sup>-2</sup> desirable still more preferably.

[0079]\*\* In a method, as a compound which has a functional group (A) and/or structure (B), The compound which has the 2nd class amino group (A1), the compound which has the 3rd class amino group (A2), The compound which has an ammonio group (A3), the compound which has a phosphatidyl group (A4), the compound which has a lysophosphatidyl group (A5), the compound which has sugar (B1), the compounds which have a steroid ring (B-2), two or more sorts of these mixtures, etc. can be used.

[0080]As a compound which has the 2nd class amino group (A1), The 2nd class amino group content polymer of the weight average molecular weight (it carries out abbreviated to the following Mw) 500-1,000,000 besides the polymer which consists of a monomer which has above (A1) (\*\*). (For example, polyethyleneimine, dicyandiamide formalin condensate, a dicyandiamide diethylenetriamine polycondensation thing, dicyandiamide diethylenetriamine and a urea

polycondensation thing, diaryl amine salt, sulfur dioxide copolymer, etc.) etc. — it is mentioned. Mw is measured by gel permeation chromatography by using a polyethylene glycol as a primary standard.

[0081]As a compound which has the 3rd class amino group (A2), the 3rd class amino group content polymer (a dicyandiamide diethylenetriamine polycondensation thing.) of Mw 500–1,000,000 besides a polymer which consists of a monomer which has above (A2) (\*\*) dicyandiamide diethylenetriamine and a urea polycondensation thing, polyhistidine, poly (N-methyl ethylene imine), etc. — etc. — it is mentioned.

[0082]As a compound which has an ammonio group (A3), ammonio group content polymer (the 4th class of methylchloride ghost of polyethyleneimine.) of Mw 500–1,000,000 besides a polymer which consists of a monomer which has above-mentioned (A3) (\*\*) dicyandiamide formalin condensate, an epichlorohydrin dimethylamine addition condensation thing, dimethyldiaryl ammonium chloride and sulfur dioxide copolymer, dimethyldiaryl ammonium chloride polymer, etc. — etc. — it is mentioned.

[0083]As a compound which has a phosphatidyl group (A4), phosphatidyl group content compound [phosphatidic acid (sodium phosphatide of hen's egg yolk origin.) besides a polymer which consists of a monomer which has above-mentioned (A4) (\*\*) beta-arachidonoyl gamma-stearoyl sodium phosphatide, Phosphatidic acid, JIRAU roil phosphatidic acid, dioleoyl phosphatidic acid, JIRAU roil sodium phosphatide and dioleoyl sodium phosphatide, phosphatidylcholine (a hydrogenation thing of hen's egg yolk origin phosphatidylcholine.) beta-acetyl-gamma-hexadecylphosphatidylcholine, jeerer KIDOIRU phosphatidylcholine, JIIRINO LEO yl phosphatidylcholine, di-transformer 2, and transformer 4-octa DEKAJI enoyl phosphatidylcholine, JISUTE aroyl phosphatidylcholine, beta-methyl-gamma-hexadecylphosphatidylcholine, beta-Oreo yl- gamma-palmitoyl phosphatidylcholine, etc., phosphatidylethanolamine (I-beam phosphatidylethanolamine of cow brain origin, and V type phosphatidylethanolamine of Escherichia coli origin.) Phosphatidylethanolamine of hen's egg yolk origin, phosphatidylethanolamine of soybean origin, dimyristoyl phosphatidylethanolamine, etc., phosphatidylglycerol (phosphatidylglycerol sodium.) Phosphatidylglycerol, dimyristoyl phosphatidylethanolamine sodium, cardiolipin disodium of cow heart origin, etc., Phosphatidylserine (dipalmitoyl phosphatidylserine, dipalmitoyl phosphatidylserine sodium, phosphatidylserine sodium of cow brain origin, etc.), Phosphatidylinositols (phosphatidylinositol sodium of wheat origin, etc.), sphingomyelin], etc. are mentioned.

[0084]As a compound which has a lysophosphatidyl group (A5), Lysophosphatidyl group content compound [lysophosphatidic acid besides the polymer which consists of a monomer which has above-mentioned (A5) (\*\*) (oleyl lysophosphatidic acid sodium, stearyl lysophosphatidic acid, etc.), lysophosphatidylcholine (lysophosphatidylcholine of hen's egg yolk origin.) Decanoyl lysophosphatidylcholine, stearyl lysophosphatidylcholine, etc., Lysophosphatidylserine (lysophosphatidylserine disodium of cow brain origin, etc.), lysophosphatidylinositol (lysophosphatidylinositol sodium of soybean origin, etc.)], etc. are mentioned.

[0085]The polymer etc. which consist of a monomer which has above (B1) as a compound which has sugar (B1) (\*\*). a sugar content compound [glycolipid (asialoganglioside and ganglioside.) Sialyl

RUISU, sialyl RAKUTOTETORAO sill ceramide, sialyl NEORAKUTOTETORAO sill ceramide, Galla clo sill ceramide, GUROBO tetra sill ceramide, glucocerebroside, monosaccharides (galactose.), such as glucosyl SERAMI and RAKURO sill ceramide Glucose, mannose, fucose, glucosamine, galactosamine, N-acetyl galactosamine, N-methylglucosamine, N-acetyl new lamin acid, Arabinose, deoxyglucose, deoxy fluoroglucose, A ribose, deoxyribose, erythrose, fructose, inositol, Lyxose, a MADOU sirloin, muramic acid, deoxy MANOSU, a sorbose, xylose and doria — polysaccharide (cellobiose.), such as cetyl glucal JIFURUKUTOSU, KOJIBIOSU, lactose, lactulose, maltitol, malt sugar, trehalose, galla KUTOSHI lactose, glucosyl sucrose, isomalt oligosaccharide, malto oligosaccharide, TEHAROSAMIN. A panose, KISHIROORIGO saccharose FUFURUKUTO oligosaccharide, All [ PARAMI / nistose, a SUTAKI sirloin chito-oligosaccharide, chitosan oligosaccharide, a mucopolysaccharide arginine acid, curdlan, dextran, levan, and ], polydextrose, pullulan, starch, cyclodextrin], etc. are mentioned.

[0086]As a compound which has a steroid ring (B-2), the bile acid (all [ KENOJI ].) of steroid ring content compound [nature or composition besides the polymer which consists of a monomer which has above-mentioned (B-2) (\*\*) Cholic acid, deoxycholic acid, glycocholic acid, Glico lithocholic acid, Sterol (BURASHIKA sterol, campesterol, cholesterol, ergosterol, fucosterol, lanosterol, a sitosterol, stigmasterol, etc.) of nature, such as RISOKORU acid, squalene, and taurocholic acid, or composition], etc. are mentioned.

[0087]As a method of contacting these compounds to a base material, the method of contacting the above and polypeptide (P) to a base material, and the same method are applicable. The amount of these compounds used ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) surface-area [ of 1 cm ] <sup>2of a base material</sup> Hits, and more than  $1 \times 10^{-6}$  is desirable still more preferred, and it is more than  $1 \times 10^{-6}$ . One or less is below  $1 \times 10^{-2}$  desirable still more preferably.

[0088]\*\* In a method, the same thing as the compound which can be used by the method of \*\* can be used as a compound which has a functional group (A) and/or structure (B). As a method of mixing the compound which has a functional group (A) and/or structure (B) in a base material, The method of molding, after mixing the compound which has a raw material which constitutes a base material, (A), and/or (B), the method of polymerizing the monomer which constitutes polyvinyl resin under existence of the compound which has (A) and/or (B) when a base material is polyvinyl resin by a publicly known method, etc. are mentioned. The amount of these compounds used ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) surface-area [ of 1 cm ] <sup>2of a base material</sup> Hits, and more than  $1 \times 10^{-6}$  is desirable still more preferred, and it is more than  $1 \times 10^{-6}$ . One or less is below  $1 \times 10^{-2}$  desirable still more preferably.

[0089]It is used suitably for cell cultures, and also a polypeptide content base material of this invention can be used as wound coating used for a therapy of a burn etc., and an in the living body embedding type charge of anagenesis material. Using a polypeptide content base material of this invention, especially as a kind of animal cell cultured, there is no restriction and a publicly known cell etc. which are used for primary culture cells and established cell lines, such as Homo sapiens, an ape, a mouse, a hamster, a rat, a dog, and an insect, and a cell culture experiment, drugs, or vaccine production can be used.

[0090]Specifically, normal cells, such as a Vero (African green monkey kidney) cell, a CHO (Chinese hamster ovary cell) cell, a MDCK (dog kidney) cell, WI38 (the Homo sapiens embryo lung)

cell, a stem cell of the Homo sapiens origin, endothelial cells, epithelial cells, a parenchymal cell, fibroblast, and a horny cell, etc. are mentioned. In these cells, needs of serum-free culture are great and the feature of a polypeptide content base material of this invention is the best for cells (a Vero cell, a MDCK cell, a CHO cell, a normal cell, etc.) used for drugs by which the maximum practical use is carried out, or vaccine production.

[0091] There is no restriction in particular as a method of culturing an animal cell using a base material of this invention, and a usual method, for example, a method etc. which are indicated to a volume for Asakura Publishing date-of-issue book tissue culture societies "technology of a tissue culture", can be applied. As a base material, for example, T-flask (culture face product; 10–500cm<sup>2</sup> etc.), When plates (two to 384 hole etc.) or dishes (culture face product; 5–500cm<sup>2</sup> etc.) are used, A way only quantity from which the depth is set to 1–20 mm carries out standing culture of the culture medium which distributed an immature mast cell by concentration of 500,000–5 million pieces / mL in CO<sub>2</sub> concentration 5 volume % and a 37 °C carbon dioxide incubator in addition to a dish or a petri dish etc. are mentioned. Under the present circumstances, it is preferred to exchange a culture medium of 1/3 quantity – the whole quantity for day by day [ 1 – 5 ].

[0092] When roller bottles (capacity; 0.1–10L etc.) are used as a base material, In addition to a roller bottle, only quantity which turns into capacity of 0.5 / 100 – 30/100 a culture medium which distributed an immature mast cell by concentration of 500,000–5 million pieces / mL in CO<sub>2</sub> concentration 5 volume % and a 37 °C carbon dioxide incubator, A method of cultivating, while making it rotate with revolving speed of 0.1–10 rpm, etc. are mentioned. Under the present circumstances, it is preferred to exchange a culture medium of 1/3 quantity – the whole quantity for day by day [ 12 – 5 ].

[0093] as a base material — a micro carrier bead (particle diameter; — 20–500-micrometer and density; 1.0–1.1g/cm<sup>3</sup>). When surface area; 100–100,000cm<sup>2</sup>/g etc. are used, A culture medium which distributed an immature mast cell by concentration of 500,000–5 million pieces / mL in spinner flasks (capacity; 10 – 500mL etc.), A method of cultivating, while only quantity which turns into capacity of 1 / 10 – 7/10 is applied at a per [ culture-medium 1L / 0.1–50g ] rate and agitates a micro carrier bead with revolving speed of 1–100 rpm in addition in CO<sub>2</sub> concentration 5 volume % and a 37 °C carbon dioxide incubator, etc. are mentioned. Under the present circumstances, it is preferred to exchange a culture medium of 1/3 quantity – the whole quantity for day by day [ 12 – 5 ]. Furthermore, a fluid bed type bioreactor and filled-up type bioreactors (capacity; 10mL – 10kL, etc.) are used instead of a spinner flask, After circulating a culture medium of one to 5 time capacity which set a micro carrier bead in a bioreactor and distributed an immature mast cell by concentration of 500,000–5 million pieces / mL, A method of carrying out continuous culture, etc. are mentioned circulating through a culture medium adjusted in CO<sub>2</sub> concentration 5 volume % and a 37 °C carbon dioxide incubator with 1–100-cm the linear velocity for /.

[0094] When using hollow fibers, such as 10–500 micrometers in inside diameter etc., as a base material, after adding to a cartridge the culture medium which distributed the immature mast cell by the concentration of 500,000–5 million pieces / mL in cartridges (capacity; 10 – 1000mL etc.), The method of circulating through and carrying out continuous culture of the culture medium adjusted in the hollow fiber in CO<sub>2</sub> concentration 5 volume % and a 37 °C carbon dioxide incubator



with 1-100-cm the linear velocity for /, etc. are mentioned.

[0095]Mature mast cells are collected by processing after culture with proteolytic enzymes, such as chelating agents, such as EDTA, or trypsin, or scratching with a scraper. The method of processing by EDTA is [ among these ] preferred.

[0096]As a culture medium, according to the kind of animal cell to be used, a MEM culture medium, a BME culture medium, A DME culture medium, alphaMEM culture medium, an IMEM culture medium, ES culture medium, DM-160 culture medium, To Asakura Publishing issue "third edition of technical of tissue culture edited by Japan Tissue Culture Association" 581 page, such as a Fisher culture medium, F12 culture medium, WE culture medium, and a RPMI culture medium, the basal medium of a description, The thing which added serum components (fetal calf serum etc.) etc., a commercial serum free medium [serum-free-medium ASF103 by Ajinomoto Co., Inc., the ASF104, the ASF301, Gibco serum-free-medium CHO-SFM, the VP-SFM], etc., etc. are used for these culture media.

[0097]When a blood serum culture medium is used, protein of ingredient strangeness, etc. are contained in a blood serum, and reproducibility is hard to be acquired, In drugs production using a cell, a purification process becomes complicated, and cost starts, What is called a serum free medium that does not contain a blood serum from Reasons of there being danger of a viral infection furthermore is preferred, and since especially a base material of this invention is excellent in adhesion and the fecundity of a cell also by a serum free medium, especially as a culture medium used with a base material of this invention, its serum free medium is preferred.

[0098]A function which raises a proliferation rate of an animal cell further, or improves cell activity, or a cell originally has can be made to reveal by making a cell growth factor (S) contain in a culture medium if needed furthermore. A cell growth factor (S) is a substance with activity which proliferates a cell. For example, FGF, VEGF, HGF, EGF, PDGF, IGF, BMP, etc. are mentioned, In addition, what is indicated to Reference documents appended, for example to 43-51 pages of University of Nagoya Press issue "tissue engineering (1999) edited by UEDA, Minoru" and the document is used.

[0099]

[Working example]Although an embodiment is hung up over below and this invention is explained to it in more detail, this invention is not limited only to these embodiments.

The polystyrene beads produced by carrying out suspension polymerization of <Embodiment 1> styrene 99 weight section and the divinylbenzene 1 weight section were sifted out by metal wire sieves (JIS Z8801-2000), and the bead which has the particle diameter between 75-106 micrometers was obtained. The volume average particle diameter measured by laser type size distribution measuring device LA-920 (made by Horiba) was 96 micrometers. The average surface area of this bead was calculated with 595 cm<sup>2</sup>/g.

[0100]According to the method of given [ in JP,H3-502935,A ] in an embodiment, the polypeptide which consists of a repeating unit of (Gly Ala Gly Ala Gly Ser)<sub>5</sub> arrangement (10) and Arg Gly Asp arrangement, It created by making it increase, and crushing and extracting transgenics Escherichia coli, the difference in (Mn) refined, and the following polypeptides were isolated.

[0101]Polypeptide (F1); (Mn) Several 10 of the RGD arrangement per 80,000 or molecule, and



several 10 of  $(\text{GAGAGS})_9$  arrangement

Polypeptide (F2); (Mn) Several 30 of the RGD arrangement per 240,000 or molecule, and several 30 of  $(\text{GAGAGS})_9$  arrangement

Polypeptide (F3); (Mn) Several 6 of the RGD arrangement per 50,000 or molecule, and several 6 of  $(\text{GAGAGS})_9$  arrangement

Polypeptide (F4); (Mn) Several 60 of RGD arrangement per 500,000 or molecule, and several 60 of  $(\text{GAGAGS})_9$  arrangement

[0102] Subsequently, the 4.5-N perchloric acid lithium fluid (concentration of polypeptide; 1mg/(ml)) of polypeptide (F1) was diluted so that concentration of polypeptide (F1) might become in ml and 100 microg /with phosphoric acid buffer liquid (PBS), and a polypeptide (F1) solution (1) was produced.

[0103] 2 g of dimethylaminoethyl methacrylate, 0.04g of azobisisobutyronitrile, and the dioxane 2g were added to a 10-ml test tube, and it shook under sealing and in a 70 °C water bath after a nitrogen purge for 4 hours. A dimethylaminoethyl methacrylate polymer (PDAM) was obtained by dropping an obtained solution into hexane 100mL, collecting parts for polymer which deposited, and drying. Subsequently, PDAM was dissolved in ion exchange water and a PDAM solution whose concentration of PDAM is 100 microg/ml was produced.

[0104] The bead 5g obtained above was added to a mixture of 37 ml of polypeptide solutions (1), and 37 ml of PDAM solutions, and it agitated under temperature of 20-30 °C by a stirring bar made from polyfluoroethylene for 12 hours. Shaking desiccation was carried out for 24 hours, having moved to a bat made from stainless steel which set an obtained bead slurry on a shaker, and spraying a 100 °C hot wind. The polypeptide content base material 1 of this invention was obtained by washing an obtained dry bead twice by PBS50ml, and drying under UV irradiation after autoclave sterilization for 20 minutes at 121 °C in PBS.

[0105] The polypeptide content base material 1 in 4.5-N perchloric acid lithium fluid 24 hours, As a result of calculating the polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 1 by measuring the content of the polypeptide (F1) eluted after churning and in perchloric acid lithium fluid supernatant liquid at 37 °C with the BCA protein reagent by a pierced earring chemical company, it was 1.1microg/cm<sup>2</sup>.

[0106] As a result of calculating the quantity of the dimethylamino group which exists the polypeptide content base material 11g in the surface of the polypeptide content base material 1 by carrying out potentiometric titration of the part handbill to 50 ml of ion exchange water with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution, they were a  $5 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0107] Instead of a <Embodiment 2> PDAM solution, dicyandiamide diethylenetriamine and a urea polycondensation thing (trade name: SANFIKKUSU 414, SANYO CHEMICAL INDUSTRIES LTD. make) are used, The polypeptide content base material 2 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using solid content as 100 microg/ml and a solution. The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 2 for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the 2nd class and tertiary amine produced by carrying out potentiometric titration by the 1/100-N solution of hydrochloric acid was a  $1 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0108] Instead of the <Embodiment 3> PDAM solution, the polypeptide content base material 3 of

this invention was obtained like Embodiment 1 except using the 100 microg [ /ml ] solution of dipalmitoyl phosphatidylglycerol. The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 3 for which it asked like Embodiment 1 is 1.1microg/cm<sup>2</sup>, The quantity of the phosphatidyl group measured using the Kainos Laboratories phospholipid measurement kit "Aqua auto Kainos Laboratories PL reagent" was a  $1 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0109]Instead of the <Embodiment 4> PDAM solution, the polypeptide content base material 4 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using the 100 microg [ /ml ] solution of cholic acid. The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 4 for which it asked like Embodiment 1 is 1.1microg/cm<sup>2</sup>, The quantity of the steroid ring measured using F-kit by the Roche diagnostics company (for steroid) was a  $4 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0110]Instead of <Embodiment 5> polypeptide (F1), the polypeptide content base material 5 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using polypeptide (F2). The polypeptide (F2) content of the polypeptide content base material 5 for which it asked like Embodiment 1 was 1.0microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the measured dimethylamino group was a  $2 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0111]Instead of <Embodiment 6> polypeptide (F1), the polypeptide content base material 6 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using polypeptide (F3). Polypeptide (F3) content of the polypeptide content base material 6 for which it asked like Embodiment 1 was 0.9microg/cm<sup>2</sup>, and quantity of a measured dimethylamino group was a  $2 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0112]Instead of <Embodiment 7> polypeptide (F1), the polypeptide content base material 7 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using polypeptide (F4). Polypeptide (F4) content of the polypeptide content base material 7 for which it asked like Embodiment 1 was 1.2microg/cm<sup>2</sup>, and quantity of a measured dimethylamino group was a  $4 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0113]It applies to a method of given [ in <Embodiment 8> JP,H3-502935,A ] in an embodiment, correspondingly, (Gly AlaGly Ala Gly Ser) The production protein polypeptide L of gene recombination Escherichia coli of the (Mn) abbreviation 90,000 including , arrangement (10) and seven Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) was created. Instead of polypeptide (F1), the polypeptide content base material 8 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using this polypeptide L. Content of the polypeptide L of the polypeptide content base material 8 for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and quantity of a measured dimethylamino group was a  $3 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0114]Instead of <Embodiment> 9 PDAM, the polypeptide content base material 9 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using Wako Pure Chem polyethyleneimine (molecular weight =70,000). The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 9 for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the secondary amine produced by carrying out potentiometric titration by the 1/100-N solution of hydrochloric acid was a  $4 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0115]Instead of the <Embodiment 10> PDAM solution, 5 g of methyichloride was added to PDAM

solution 100mL, and the polypeptide content base material 10 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using the solution produced by making react for 8 hours at 80 \*\*. The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 10 for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the quarternary ammonium salt produced by carrying out potentiometric titration by the 1/100-N solution of hydrochloric acid was a  $2 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0116]Instead of <Embodiment> 11 PDAM, the polypeptide content base material 11 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using a Wako Pure Chemical Industries, Ltd. make ganglioside G bobbin brain. The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 11 for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the sugar obtained using the "object for F-kit sugar" by the Roche diagnostics company was a  $1 \times 10^{18}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0117]The polypeptide content base material 12 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using the polypeptide solution (2) whose concentration of polypeptide (F1) is 45 microg/ml instead of <Embodiment 12> polypeptide solution (1). The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 12 for which it asked like Embodiment 1 was 0.3microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the measured dimethylamino group was a  $2 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0118]The polypeptide content base material 13 of this invention was obtained like Embodiment 1 except using the polypeptide solution (3) whose concentration of polypeptide (F1) is 1000 microg/ml instead of <Embodiment 13> polypeptide solution (1). The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 13 for which it asked like Embodiment 1 was 10.0microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the measured dimethylamino group was a  $3 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with N/100 silver nitrate aqueous solution.

[0119]The polystyrene beads produced by carrying out suspension polymerization of <Embodiment 14> styrene 98 weight section, divinylbenzene 1 weight section, and the dimethylaminoethyl methacrylate 1 weight section are sifted out by metal wire sieves (JIS Z8801-2000), The bead which has the particle diameter between 75-106 micrometers was obtained. The volume average particle diameter measured by laser type size distribution measuring device LA-920 (made by Horiba) was 93 micrometers. The average surface area of this bead was calculated with 626 cm<sup>2</sup>/g.

[0120]The bead 5g obtained above was added to 37 ml of polypeptide solutions (1), and it agitated under the temperature of 20-30 \*\* by the stirring bar made from polyfluoroethylene for 12 hours. Shaking desiccation was carried out for 24 hours, having moved to the bat made from stainless steel which set the obtained bead slurry on the shaker, and spraying a 100 \*\* hot wind. The polypeptide content base material 14 of this invention was obtained by washing the obtained dry bead twice by PBS50ml, and drying under UV irradiation after autoclave sterilization for 20 minutes at 121 \*\* in PBS.

[0121]The polypeptide (F1) content of the polypeptide content base material 14 for which it asked like Embodiment 1 was 0.9microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the dimethylamino group measured by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution was a  $1 \times 10^{17}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0122]Instead of the <comparative example 1> polypeptide solution (1), the base material 15 for comparison was obtained like Embodiment 1 except using PBS. The quantity of the dimethylamino group of the base material 15 for comparison for which it asked like Embodiment 1 was a  $4 \times 10^{15}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0123]Instead of the <comparative example 2> PDAM solution, the base material 16 for comparison was obtained like Embodiment 1 except using PBS. The SLPF content of the base material 16 for comparison for which it asked like Embodiment 1 was 1.0microg/cm<sup>2</sup>.

[0124]Instead of the <comparative example> 3 PDAM, the base material 17 for comparison was obtained like Embodiment 1 except using the poly-L-lysine by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. The SLPF content of the base material 17 for comparison for which it asked like Embodiment 1 was 1.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the 1st class amino group was a  $1 \times 10^{14}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0125]Instead of the <comparative example 4> polypeptide solution (1), the base material 18 for comparison was obtained like Embodiment 2 except using PBS. The quantity of the 2nd class and tertiary amine of the base material 18 for comparison for which it asked like Embodiment 2 was a  $1 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0126]Instead of the <comparative example 5> polypeptide solution (1), the base material 19 for comparison was obtained like Embodiment 3 except using PBS. The quantity of the phosphatidyl group of the base material 19 for comparison for which it asked like Embodiment 3 was a  $1 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0127]Instead of the <comparative example 6> polypeptide solution (1), the base material 20 for comparison was obtained like Embodiment 4 except using PBS. The quantity of the steroid ring of the base material 20 for comparison for which it asked like Embodiment 4 was a  $4 \times 10^{16}$  individual /cm<sup>2</sup>.

[0128]<Cell culture> The non-blood serum cell culture experiment was conducted using the obtained base materials 1-20. It adds 6g of base materials 1-20 at a time to 20 1L spinner flasks, respectively, 245-ml serum-free-medium Gibco OptiPro-SFM by in vitro JIEN is added, Adding 5 ml of things which distributed the MDCK cell [purchase from Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.] to a cell concentration:  $5.0 \times 10^6$  individual / mL after the bottom temperature control of churning for 20 minutes at 37 \*\* (cell density = 100,000 pieces/(ml)), and agitating at 25 rpm. It cultivated at 37 \*\* among the mixture (carbon dioxide/air = 5/95 volume ratio) of carbon dioxide and air. In order to evaluate the initial adhesive property to a base material and to evaluate fecundity in 30 minutes again in one day and three days. After removing the cell which samples 1 ml of suspension of a base material under churning, respectively, washes a base material by PBS, and has not been pasted up on a base material, the nucleus using Crystal Violet according the number of nuclei to Wiesel (Wezel) — calculation — by calculating by a method (nuclei-countingmethod), cell density (unit : 10,000 pieces/(ml)) was measured. A result is shown in Table 1.

[0129]

[Table 1]

	実 施 例														比 較 例					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6
基材番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
30分後	5	6	4	6	4	4	6	5	6	4	6	5	5	4	3	2	4	3	1	2
1日後	18	19	18	19	18	17	20	18	18	17	19	18	18	17	5	9	12	6	8	7
3日後	75	80	70	78	75	70	78	75	80	70	78	77	72	74	15	40	50	22	32	34

[0130]The cell density (10,000 pieces/(ml)) at the time of using a blood serum culture medium (FBS10% content MEME) instead of serum-free-medium Gibco OptiPro-SFM by in vitro JIEN using the base material 15 of the comparative example 1 was;70 after [ of after / of after / 30 minutes /; / 5 or 1 day /; ] 16 or 3 days.

[0131]To a product 60-mm made from <Embodiment 15> Asahi techno glass phi cell culture dish (culture face product; 28 cm<sup>2</sup> / individual). Natural seasoning was carried out by adding 1.5 ml of things which diluted with PBS this weight mixture of the polypeptide solution (1) and the PDAM solution obtained in Embodiment 1 10 times, being within a 20-25 \*\* clean bench, and neglecting it for one week. Furthermore, it washed twice by PBS5ml, and the polypeptide content base material (dish 1) of this invention was obtained.

[0132]Add 3 ml of 4.5-N perchloric acid lithium fluid to the dish 1, and at 37 \*\* After 48-hour shake, As a result of calculating the polypeptide (F1) content of the dish 1 by measuring the content of the polypeptide (F1) eluted in perchloric acid lithium fluid supernatant liquid with the BCA protein reagent by a pierced earring chemical company, it was 2.0 microg[ /cm ]<sup>2</sup>. As a result of calculating the quantity of the dimethylamino group which exists in the surface of the dish 1 by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution in addition to [ 1.5 ml of ion exchange water ] the dish 1, they were a 1x10<sup>17</sup> individual /cm<sup>2</sup>.

[0133]The polypeptide content base material (dish 2) of this invention was obtained like Embodiment 15 except using the polypeptide L instead of <Embodiment 16> polypeptide (F1). The polypeptide L content of the dish 2 for which it asked like Embodiment 15 was 2.1microg/cm<sup>2</sup>, and the quantity of the measured dimethylamino group was a 1x10<sup>17</sup> individual /cm<sup>2</sup> by carrying out potentiometric titration with a 1/100-N silver nitrate aqueous solution.

[0134]Instead of the <comparative example 7> polypeptide solution (1), the dish 3 for comparison was obtained like Embodiment 15 except using PBS. The quantity of the dimethylamino group of the dish 3 for which it asked like Embodiment 15 was a 4x10<sup>16</sup> individual /cm<sup>2</sup>.

[0135]<Cell culture> The non-blood serum cell culture experiment was conducted using the obtained dishes 1-3. To each dish, to serum-free-medium Gibco OptiPro-SFM by in vitro JIEN. a MDCK cell [purchase from Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.] — cell concentration: — 5 ml of things distributed to 20,000 piece / mL were added (total cell count; 100,000 pieces), and culture was performed for three days at 37 \*\* among the mixture (carbon dioxide/air = 5/95 volume ratio) of carbon dioxide and air. Processed the dish with trypsin, the cell was made to float, and the cell number (10,000 pieces) was measured under the microscope using the blood cell count board. The result is shown in Table 2.

[0136]

[Table 2]

	実 施 例		比較例
	1 5	1 6	7
ディッシュ番号	1	2	3
細胞数 (万個)	7 2	7 8	4 2

[0137]The cell number at the time of using a blood serum culture medium (FBS10% content MEME) instead of serum-free-medium Gibco OptiPro-SFM by in vitro JIEN using the dish 3 of the comparative example 7 was 650,000 pieces.

[0138]When the polypeptide content base material of this invention is used from the above embodiment and comparative example, The cellular adhesiveness and cell-growth nature superior to what coated independent [ , such as the above and polypeptide (F1), ] like the case where a blood serum culture medium is used also in serum-free culture are obtained, and it turns out that a cell can be cultured efficiently.

[0139]

[Effect of the Invention]If the base material of this invention is used, a cell can be efficiently cultured also by a non-blood serum, and perfect non-blood serum-ization of production of the drugs using an animal cell or a vaccine can be realized.

[0140]

[Layout Table]

<110> SANYO CHEMICAL INDUSTRIES LTD.; SANYO. CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.<120> polypeptide content base material <160>11<210>1<211>4<212>PRT<213>Homo sapiens<400>1Arg Glu Asp Val 1<210>2<211>5<213>PRT<213>Homo sapiens<400>2Tyr Ile Gly Ser Arg 1 5<210>3<211>5<213>PRT<213>Homo sapiens<400>3Pro. Asp Ser Gly Arg 1 5<210>4<211>7<213>PRT<213>Homo sapiens<400>4Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg 1 5<210>5<211>6<213>PRT<213>Homo sapiens<400>5Leu Gly Thr Ile Pro Gly 1 5<210>6<211>10<213>PRT<213>Homo sapiens<400>6Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile 1 5 10<210>7<211>5<213>PRT<213>Homo sapiens<400>7Ile Lys Val Ala Val 1 5<210>8<211>4<213>PRT<213>Homo sapiens<400>8Asp Gly Glu Ala 1<210>9<211>6<213>PRT<213>Bombyx mori<400>9Gly Ala Gly Ala Gly Ser 1 5<210>10<211>54<213>PRT<213>Bombyx mori<400>10Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala 1 5 10 15 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala 20 25 30Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser 35 40 45 Gly Ala Gly Ala Gly Ser 50 — <210>11<211>30<213>PRT<213>Homo sapiens<400>11Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly 1 5 10 15Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro 20 25 30

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-304868

(P2003-304868A)

(43) 公開日 平成15年10月28日 (2003. 10. 28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-73-ド (参考)

C 1 2 N 5/06

Z N A

C 0 7 K 14/47

4 B 0 6 5

// C 0 7 K 14/47

C 1 2 N 5/00

Z N A E

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 17 頁)

(21) 出願番号

特願2002-114241(P2002-114241)

(71) 出願人 000002288

三洋化成工業株式会社

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1

(22) 出願日

平成14年4月17日 (2002. 4. 17)

(72) 発明者 大隅 辰也

京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋  
化成工業株式会社内

Fターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y BB32 BC41

CA60

4H045 AA30 BA13 BA14 BA15 BA18

BA20 CA40 DA00 EA60

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド含有基材

(57) 【要約】

【課題】 細胞の接着性及び増殖性が高く、特に無血清培地でも効率的に培養できる基材を提供すること。

【解決手段】 細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド

(P) を含んでなり、かつ2級アミノ基 (A 1)、3級アミノ基 (A 2)、アンモニオ基 (A 3)、ホスファチジル基 (A 4) 及びリゾホスファチジル基 (A 5) からなる群より選ばれる少なくとも1つの官能基 (A)、並びに/又は糖 (B 1) 及びステロイド環 (B 2) から選ばれる少なくとも1つの構造 (B) を有してなることを特徴とするポリペプチド含有基材を用いる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド

(P)を含んでなり、かつ2級アミノ基(A1)、3級アミノ基(A2)、アンモニオ基(A3)、ホスファチジル基(A4)及びリゾホスファチジル基(A5)からなる群より選ばれる少なくとも1つの官能基(A)、並びに/又は糖(B1)及びステロイド環(B2)から選ばれる少なくとも1つの構造(B)を有してなることを特徴とするポリペプチド含有基材。

【請求項2】 ポリペプチド(P)と官能基(A)及び/又は構造(B)との全て又は一部が基材表面に存在してなる請求項1記載のポリペプチド含有基材。

【請求項3】 ポリペプチド(P)の含有量( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )が基材の表面積 $1\text{cm}^2$ 当たり0.1以上100以下である請求項1又は2に記載のポリペプチド含有基材。

【請求項4】 ポリペプチド(P)の細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列の数が、(P)1分子中に3~50個である請求項1~3のいずれかに記載のポリペプチド含有基材。

【請求項5】 ポリペプチド(P)の細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列が、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列

(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)及びHis Ala Val配列からなる群より選ばれる少なくとも1種の配列である請求項1~4のいずれかに記載のポリペプチド含有基材。

【請求項6】 官能基(A)及び/又は構造(B)の含有量が基材の表面積 $1\text{cm}^2$ 当たり $1\times 10^{15}$ ~ $1\times 10^{20}$ 個である請求項1~5のいずれかに記載のポリペプチド含有基材。

【請求項7】 官能基(A)が、ジメチルアミノ基、トリメチルアンモニオ基、ジエチルアミノ基、ジエチルメチルアンモニオ基及び/若しくはグアニジノ基、並びに/又はジシアンジアミドとホルマリンとの重縮合物、ジシアンジアミドとジエチレントリアミンとの重縮合物、エピクロロヒドリンとジメチルアミンとの付加重合物、ジメチルジアルリルアミンモニウムクロリド重合物及びジアルリルアミン塩酸塩と二酸化硫黄との共重合物からなる群より選ばれる少なくとも1つの重合体に含まれる2級アミノ基、3級アミノ基、アンモニオ基、イミノ基、アミジノ基及び/若しくはグアニジノ基である請求項1~6のいずれかに記載のポリペプチド含有基材。

【請求項8】 基材が、体積平均粒子径( $\mu\text{m}$ )が50以上100以下、かつ密度( $\text{g}/\text{cm}^3$ )が1.02以上1.04以下の微粒子である請求項1~7のいずれか

に記載のポリペプチド含有基材。

【請求項9】 スチレン及び多官能性モノマーを必須構成単量体としてなる合成高分子を含んでなる請求項1~9のいずれかに記載のポリペプチド含有基材。

【請求項10】 請求項1~9のいずれかに記載のポリペプチド含有基材を用い、無血清培地にて動物細胞を培養することを特徴とする動物細胞の生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリペプチド含有基材に関する。さらに詳しくは、細胞の接着・増殖性が高く、特に、無血清培地を用いても、血清含有培地と同等以上の接着・増殖性を与える動物細胞培養用のポリペプチド含有基材に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】Arg Gly Asp配列を有する遺伝子組換えペプチドであるプロネクチンF(以下、PnFと略する。)やポリ-L-リジンをコートした樹脂微粒子に対する細胞接着性を、0.5%の血清を含有した培地を使用して研究発表されている(バラニ(J.Varani),インマン(D.R.Inman),フリギール(S.E.G.Fligiel),ヒリガス(W.J.Hillegas)、サイトテクノロジー(Cytotechnology)13,1993年、89-98頁)。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】この研究発表において、PnFを $0.005\mu\text{g}/\text{cm}^2$ あるいは $0.025\mu\text{g}/\text{cm}^2$ コートした場合、コートしない場合のそれぞれ3倍又は5倍の細胞接着性を示すが、接着・増殖性がさらに高いものが強く要望されている。一方、同研究発表で、ポリ-L-リジンを $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ コートした場合に、コートしない場合の約41倍の細胞接着性を示すが、この場合、細胞の伸展が遅いという問題がある。すなわち、本発明の目的は、動物細胞の接着性及び増殖性が高く、特に無血清培地でも動物細胞の接着性及び増殖性が高く、細胞を効率的に培養できる動物細胞培養用基材を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究を重ね、特定のポリペプチドと特定の官能基及び/又は特定の構造をその表面に配した基材を用いることにより、初期の細胞付着性が高まり、かつ、増殖性が高くなることを見だし本発明に到達した。すなわち、本発明のポリペプチド含有基材の特徴は、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド(P)を含んでなり、かつ2級アミノ基(A1)、3級アミノ基(A2)、アンモニオ基(A3)、ホスファチジル基(A4)及びリゾホスファチジル基(A5)からなる群より選ばれる少なくとも1つの官能基(A)、並びに/又は糖(B1)及びステロイド環(B2)から選ばれる少なくとも1つの構造(B)を有



してなる点を要旨とする。

#### 【0005】

【発明の実施の形態】細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列としては、接着シグナルとして働くものであればいずれも使用でき、例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7 (1990) 527頁に記載されているもの等が使用できる。

【0006】これらのうち、接着する細胞の種類が多いという点で、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列 (1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列 (2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列 (3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列 (4)、Leu Gly Thr Ile Pro Glu配列 (5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列 (6)、Ile Lys Val Ala Val配列 (7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列 (8) 及びHis Ala Val配列が好ましく、さらに好ましくはArg Gly Asp配列、Ile Lys Val Ala Val配列 (7) 及びHis Ala Val配列である。これらの配列は1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。なお、アミノ酸配列はアミノ酸3文字表記で現わし、( ) 内にアミノ酸配列表に対応する配列番号を付記した。

【0007】ポリペプチド (P) 中には前記最小アミノ酸配列が1分子中に少なくとも1個含有される必要がある。前記最小アミノ酸配列を含有すると、細胞接着活性が高まり、本来の機能を維持した状態で動物細胞の増殖をさらに促進することが可能となる。一方、前記最小アミノ酸配列が含有されない場合、細胞接着性が低下する。この結果、特に無血清培地を用いる場合に細胞の増殖が不十分になる。

【0008】この最小アミノ酸配列の (P) 1分子中の含有量は、細胞接着・増殖性の観点から、1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは5～40個、特に好ましくは10～30個である。含有量がこの範囲であると、細胞接着活性がさらに高まり、本来の機能を維持した状態で動物細胞の増殖を促進することが容易となりやすい傾向にある。

【0009】ポリペプチド (P) の数平均分子量 (以下、Mnと略する) は、細胞に対する毒性が低く、接着性能が高いという点で、5,000以上が好ましく、さらに好ましくは10,000以上、特に好ましくは50,000以上である。また5,000,000以下が好ましく、さらに好ましくは1,000,000以下、特に好ましくは500,000以下である。なお、ポリペプチド (P) の (Mn) は、SDS-PAGE法 (Naドデシルスルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動法) で、(P) を水中で展開し、泳動距離を標準物質と比較することによって求められる。

【0010】ポリペプチド (P) は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列以外に、(P) の熱安定性が高まるアミノ酸配列、例えばシルクフィブロイン由来の

GlyAla Gly Ala Gly Ser配列 (9) を少なくとも2個、分子中に有することが好ましく、このアミノ酸配列を5個以上有することがさらに好ましく、3～30個有することが特に好ましい。

【0011】ポリペプチド (P) としては、例えば、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 配列 (10) とArg Gly Asp配列とを有するポリペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 配列 (10) とTyr Ile Gly Ser Arg配列 (2) とを有するポリペプチド、(Gly Ala Pro (Gly Pro Pro)) 配列 (11) とArg Gly Asp配列とを有するポリペプチド、(Gly Ala Pro (Gly Pro Pro)) 配列 (11) とTyr Ile Gly Ser Arg配列 (2) とを有するポリペプチド、及び (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 配列 (10) とIle Lys Val Ala Val配列 (7) とを有するポリペプチド (特表平3-502935号公報) 等が挙げられる。

【0012】ポリペプチド (P) として市場から入手できるものとしては、例えば、三洋化成工業 (株) 製プロネクチンF (遺伝子組替大腸菌により製造され、1分子中にArg Gly Asp配列と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 配列 (10) とを各々約13個有する (Mn) 約11万のポリペプチド)、同プロネクチンFプラス (プロネクチンFをジメルアミノエチルクロライドと反応させて水溶性にしたもの)、同プロネクチンL (遺伝子組替大腸菌により製造され、1分子中にIle Lys Val Ala Val配列 (7) と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) 配列 (10) とを各々約7個有する (Mn) 約9万のポリペプチド) 等が挙げられる。

【0013】また、宝酒造 (株) 製RetroNectin (リコンビナントヒトフィブロネクチンCH-296) (ヒトフィブロネクチン細胞接着シグナルであるCS1シグナルと細胞接着ドメインType III及びヘパリン結合ドメインIIを1つずつ有する (Mn) 約6万のポリペプチド)、同RGDS-Protein A (Arg Gly Asp配列をProtein A (IgG結合ドメイン) に挿入した (Mn) 約3万のポリペプチド) もポリペプチド (P) として使用可能である。

【0014】ポリペプチド (P) の製造方法は特に制限されず、ペプチドを合成する従来既知の方法と同様にして製造することができ、例えば、有機合成法 (固相合成法、液相合成法等) 及び生化学的合成法 [遺伝子組換微生物 (酵母、細菌、大腸菌等)] 等によって合成することができる。

【0015】有機合成法に関しては、例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2、タンパク質の化学 (下)」第641～694頁 (昭和62年5月20日; 株式会社東京化学同人発行) に記載されている方法等が用いられる。

【0016】生化学的合成法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報に記載されている方法等が用

いられる。高分子量のポリペプチド(P)を容易に合成できる点で、遺伝子組換え微生物による生化学的合成法が好ましく、特に好ましくは遺伝子組換え大腸菌を用いて合成する方法である。

【0017】ポリペプチド(P)は、その全て又は一部が基材表面に存在していることが好ましく、さらに好ましくは(P)の全てが基材表面に存在していることである。なお、基材表面とは、基材が容器状の場合、容器内に培養液を入れた場合に培養液が接し得る面を意味し、10 基材が粒子状の場合、基材を培養液中に入れた場合に培養液が接触し得る面を意味する。

【0018】基材表面のポリペプチド(P)の量( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )としては、細胞の接着・増殖性の観点から、基材の表面積1 $\text{cm}^2$ 当たり0.1以上が好ましく、さらに好ましくは0.2以上、特に好ましくは0.3以上である。また経済性の観点から、100以下が好ましく、さらに好ましくは50以下、特に好ましくは10以下である。なお、基材表面のポリペプチド(P)の量は、通常のタンパク量測定試薬(例えば、ピアスケミカル社製BCA蛋白試薬等)で測定することができる。また、基材20 の表面積は、基材が容器状の場合は、この基材表面の形状から算出でき、基材が球状粒子の場合は、その平均粒子径及び密度から計算でき[粒子径;  $2r$  ( $\mu\text{m}$ )、密度;  $d$  ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) のとき、表面積 ( $\text{cm}^2/\text{g}$ ) は、 $4\pi r^2 / (4/3\pi r^3 \cdot d) = 3/(r \cdot d)$ ]、多孔質の粒子状の場合、BET値比表面積計(例えば、商品名: Q UANTASORB、ユアサイオニクス社製、測定ガス:  $\text{He}/\text{Kr} = 99.9/0.1$  体積%、検量ガス: 窒素)で定量できる。

【0019】2級アミノ基(A1)としては、脂肪族アミノ基、芳香族アミノ基、 $-\text{NHCH}_2-$ で表される基及び $-\text{C}(=\text{NH})-$ で表される基等が使用できる。これらの炭素数は1~16が好ましく、さらに好ましくは1~12、特に好ましくは1~6である。

【0020】脂肪族アミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基、シクロヘキシルアミノ基、2-エチルヘキシルアミノ基、ドデシルアミノ基、ヘキサデシルアミノ基、ベンジルアミノ基及び2-フェニルエチルアミノ基等が挙げられる。

【0021】芳香族アミノ基としては、フェニルアミノ基(アニリノ基)、4-メチルフェニルアミノ基(4-メチルアニリノ基)及びナフチルアミノ基等が挙げられる。これらのうち、脂肪族アミノ基、 $-\text{NHCH}_2-$ で表される基及び $-\text{C}(=\text{NH})-$ で表される基が好ましく、さらに好ましくはメチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、 $-\text{NHCH}_2-$ で表される基及び $-\text{C}(=\text{NH})-$ で表される基、特に好ましくは $-\text{NHCH}_2-$ で表される基及び $-\text{C}(=\text{NH})-$ で表される基である。

【0022】3級アミノ基(A2)としては、脂肪族アミノ基、芳香族アミノ基、 $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{OH})\text{CH}_2-$ 又は $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ で表される基等が使用できる。これらの炭素数は2~32が好ましく、さらに好ましくは2~24、特に好ましくは2~12である。

【0023】脂肪族アミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、メチルプロピルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基、ジシクロヘキシルアミノ基、ジドデシルアミノ基、ジヘキサデシルアミノ基及びジベンジルアミノ基等が挙げられる。

【0024】芳香族アミノ基としては、ジフェニルアミノ基及びジナフチルアミノ基等が挙げられる。これらのうち、脂肪族アミノ基、 $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{OH})\text{CH}_2-$ 又は $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ で表される基が好ましく、さらに好ましくは、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基及び $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{OH})\text{CH}_2-$ 又は $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ で表される基、特に好ましくはジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基及び $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{OH})\text{CH}_2-$ 又は $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ で表される基である。

【0025】アンモニオ基(A3)としては、脂肪族アンモニオ基、芳香族アンモニオ基、 $>\text{C}=\text{N}^+=\text{C}<$ で表される基及び $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ で表される基等が使用できる。これらの炭素数は1~48が好ましく、さらに好ましくは2~36、特に好ましくは2~18である。

【0026】脂肪族アンモニオ基としては、メチルアンモニオ基、エチルアンモニオ基、プロピルアンモニオ基、ブチルアンモニオ基、シクロヘキシルアンモニオ基、2-エチルヘキシルアンモニオ基、ドデシルアンモニオ基、ヘキサデシルアンモニオ基、ベンジルアンモニオ基、2-フェニルエチルアンモニオ基、ジメチルアンモニオ基、ジエチルアンモニオ基、メチルプロピルアンモニオ基、ジイソプロピルアンモニオ基、ジブチルアンモニオ基、ジシクロヘキシルアンモニオ基、ジドデシルアンモニオ基、ジヘキサデシルアンモニオ基、ジベンジルアンモニオ基、トリメチルアンモニオ基、トリエチルアンモニオ基、メチルジエチルアンモニオ基、メチルジイソプロピルアンモニオ基、メチルジブチルアンモニオ基、メチルジシクロヘキシルアンモニオ基、メチルジドデシルアンモニオ基、トリヘキサデシルアンモニオ基及びトリベンジルアンモニオ基等が挙げられる。

【0027】芳香族アンモニオ基としては、ベンジルアンモニオ基、メチルフェニルアンモニオ基、メチルナフチルアンモニオ基、メチルジフェニルアミノ基、メチルジナフチルアミノ基及びトリベンジルアンモニオ基等が挙げられる。

【0028】これらのうち、脂肪族アンモニオ基、 $>\text{C}=\text{N}^+=\text{C}<$ で表される基及び $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ で表される基が好ましく、さらに好ましくは、メチ

ルアンモニオ基、エチルアンモニオ基、プロピルアンモニオ基、ブチルアンモニオ基、トリメチルアンモニオ基、トリエチルアンモニオ基、メチルジエチルアンモニオ基、メチルジイソプロピルアンモニオ基、メチルジブチルアンモニオ基、 $>C=N^+=C<$ で表される基及び $-CH_2N(CH_3)_2CH_2-$ で表される基、特に好ましくは、メチルアンモニオ基、エチルアンモニオ基、トリメチルアンモニオ基、トリエチルアンモニオ基、メチルジエチルアンモニオ基、 $>C=N^+=C<$ で表される基及び $-CH_2N(CH_3)_2CH_2-$ で表される基である。

【0029】ホスファチジル基(A4)としては、 $HOCH_2CH(OH)CH_2OP(=O)(O^-)-$ で表される基(無置換ホスファチジル基)又は $R^1OCH_2CH(OR^2)CH_2OP(=O)(O^-)-$ で表される基(置換ホスファチジル基、 $R^1$ 及び $R^2$ は、同じ又は異なる飽和又は不飽和のアシル基、アルキル基又はアルケニル基である)等が使用できる。アシル基、アルキル基又はアルケニル基の炭素数は1~22が好ましく、さらに好ましくは2~18、特に好ましくは12~18である。

【0030】アシル基としては、飽和アシル基(アセチル基、ブタノイル基、ヘキサノイル基、デカノイル基、ラウロイル基、ミリスチル基、パルミトイル基、ステアロイル基及びアラキドノイル基等)、及び不飽和アシル基(リノレイル基、オクタデシエノイル基及びオレイル基等)等が挙げられる。

【0031】アルキル基としては、メチル基、ヘキサデシル基、ブチル基、ヘキシル基、デシル基、ラウリル基、ミリスチル基、パルミチル基、ステアリル基及びアラキドイル基等が挙げられる。

【0032】アルケニル基としては、リノレイル基、オクタデシルジエニル基及びオレイル基等が挙げられる。これらのうち、無置換ホスファチジル基及び置換ホスファチジル基( $R^1$ 及び $R^2$ はアシル基である)が好ましく、さらに好ましくは無置換ホスファチジル基及び置換ホスファチジル基( $R^1$ 及び $R^2$ は不飽和アシル基である)、特に好ましくは置換ホスファチジル基( $R^1$ 及び $R^2$ は同じ不飽和アシル基である)ホスファチジル基である。

【0033】リゾホスファチジル基(A5)としては、 $R^3OCH_2CH(OH)CH_2OP(=O)(O^-)-$ で表される基( $R^3$ は、飽和又は不飽和のアシル基)等が使用できる。アシル基の炭素数は1~22が好ましく、さらに好ましくは2~18、特に好ましくは12~18である。

【0034】アシル基としては、ホスファチジル基(A4)の場合と同じものが使用できる。これらのうち、 $R^3$ が不飽和アシル基である置換リゾホスファチジル基が好ましい。

【0035】糖(B1)としては、次の化学式(化1)

10

20

30

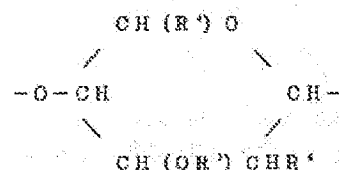
40

50

で表される基を1個以上有する構造等が使用でき、例えば、天然又は合成の糖が含有する構造等が用いられる。

【0036】

【化1】



【0037】( $R'$ は、 $-H$ 、 $-COO$ 、 $-CH_2O$ 、 $H$ 、 $-CH_2OCOCH_3$ 、 $-CH_2OSO_3$ 又は $-CH_2$ のいずれかを表し、 $R''$ は、 $-H$ 、 $-COCH_3$ 、 $-CH_3$ 又は $-CH(CH_3)COO$ のいずれかを表し、 $R'$ は、 $-OH$ 、 $-OCOCH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHCOCH_3$ 、 $-NHCOCH_2OH$ 又は $-F$ のいずれかを表す。)

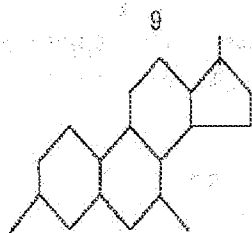
【0038】天然又は合成の糖としては、単糖類(ガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、グルコサミン、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-メチルグルコサミン、N-アセチルニューラミン酸、アラビノース、デオキシグルコース、デオキシフルオログルコース、リボース、デオキシリボース、エリスロース、フルクトース、イノシトール、リクソース、マドウロース、ムラミン酸、デオキシマンノース、ソルボース、キシロース及びトリアセチルグルカル等)、多糖類(セロビオース、ジフルクトース、コジビオース、ラクトース、ラクツロース、マルチトール、マルトース、トレハロース、ガラクトシラクトース、グルコシルスクロース、イソマルトオリゴサッカライド、マルトオリゴサッカライド、テハロサミン、パノース、キシロオリゴサッカロース、フルクトオリゴサッカライド、ニストース、スタキロース、キトオリゴ糖、キトサンオリゴ糖、ムコ多糖、アルギニン酸、カードラン、デキストラン、レバン、パラミオール、ポリデキストロース、プルラン、スターチ及びシクロデキストリン等)等が挙げられる。

【0039】これらのうち、ガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、グルコサミン、ガラクトサミン、N-メチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン及びN-アセチルニューラミン酸が好ましく、さらに好ましくはガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミン及びN-アセチルニューラミン酸である。

【0040】ステロイド環(B2)としては、次の化学式(化2)で表される環構造等が使用でき、例えば、天然又は合成の胆汁酸又はステロールに含まれるステロイド環等が用いられる。

【0041】

【化2】



【0042】天然又は合成の胆汁酸としては、ケノジオール、コール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、グリコリトコール酸、リソコール酸、スクアレン及びタウロコール酸等が挙げられる。

【0043】天然又は合成のステロールとしては、ブラシカステロール、カンベステロール、コレステロール、エルゴステロール、フコステロール、ラノステロール、シトステロール及びスチグマステロール等が挙げられる。これらのうち、胆汁酸に含まれるステロイド環が好ましく、さらに好ましくはコール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、グリコリトコール酸又はリソコール酸に含まれるステロイド環である。

【0044】官能基(A)及び構造(B)は、その全て又は一部が基材表面に存在していることが好ましく、全てが基材表面に存在していることがさらに好ましい。基材表面の官能基(A)及び構造(B)の含有量(個/cm<sup>2</sup>)は、細胞の初期付着性向上効果又は増殖性向上効果の観点から、基材の表面積1cm<sup>2</sup>当り、 $1 \times 10^{11}$  ~  $1 \times 10^{16}$  が好ましく、さらに好ましくは  $1 \times 10^{15}$  ~  $1 \times 10^{16}$ 、特に好ましくは  $1 \times 10^{15}$  ~  $1 \times 10^{17}$  である。

【0045】基材表面の官能基(A)及び構造(B)の含有量は、官能基(A)及び構造(B)の種類によって以下の方法により定量される。2級アミノ基(A1)、3級アミノ基(A2)及びアンモニオ基(A3)の場合、通常のアミン価測定試薬(例えば、塩酸水溶液又は硝酸銀水溶液等)を用いて、電位差滴定によりアミン価を測定することにより求めることができる。

【0046】ホスファチジル基(A4)、リゾホスファチジル基(A5)、糖(B1)及びステロイド環(B2)の場合、酵素定量法により求めることができる。すなわち、ホスファチジル基(A4)及びリゾホスファチジル基(A5)の場合、例えば、カイノス社製リン脂質測定キット「アクアオート カイノス PL試薬」等を用いることにより求めることができる。また、糖(B1)の場合、ロッシュダイアグノスティックス社製「F-キット 糖質用」を用いることにより求めることができる。また、ステロイド環(B2)の場合、例えば、ロッシュダイアグノスティックス社製「F-キット ステロイド用」等を用いることにより求めることができる。

【0047】本発明のポリペプチド含有基材の製造に用いられる基材としては、細胞培養用基材として通常使用されるもの等が使用でき、例えば、シャーレ、プレート、フラスコ、ローラーボトル、マイクロキャリアビー

10

ズ及びホローファイバー等が挙げられる。これらの基材の素材としては、無機物(ガラス、セラミックス及びヒドロキシアパタイト等)、及び有機物(合成高分子[ビニル樹脂(ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルホルマール、ポリメチルメンテン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリエチレン及びポリプロピレン等)、ポリエステル、ポリカーボネート、ウレタン樹脂及びエポキシ樹脂]及び天然高分子(ポリデキスラン、セルロース、コラーゲン及びゼラチン等))等が挙げられる。

【0048】シャーレとしては、基材の表面積(培養面積)が5~500cm<sup>2</sup>/個のものが挙げられる。プレートとしては、2~384穴/プレートのもものが挙げられる。フラスコとしては、基材の表面積(培養面積)が10~500cm<sup>2</sup>/個のT-フラスコ及びスピナーフラスコ等が挙げられる。ローラーボトルとしては、容量が0.1~10L/個のもの等が挙げられる。マイクロキャリアビーズとしては、粒子径:20~500μm、密度:1.0~1.1g/cm<sup>3</sup>、基材の表面積(培養面積):100~100,000cm<sup>2</sup>/gのものが挙げられる。ホローファイバーとしては、内径が10~500μmのもの等が挙げられる。

【0049】これらの基材のうち、効率的に高密度の細胞が得られるという点で、マイクロキャリアビーズが好ましい。粒子径(μm)としては、単位重量当りの表面積が大きく、また、細胞が接着し易いという点で、30以上が好ましく、さらに好ましくは40以上、特に好ましくは50以上である。また300以下が好ましく、さらに好ましくは200以下、特に好ましくは100以下である。また、密度(g/cm<sup>3</sup>)としては、緩やかな攪拌で浮遊し、また、攪拌を停止すると速やかに沈降しやすいという点で、1.0以上が好ましく、さらに好ましくは1.01以上、特に好ましくは1.02以上である。また1.1以下が好ましく、さらに好ましくは1.05以下、特に好ましくは1.04以下である。

【0050】また、細胞との親和性が高く、耐熱性に優れるという点で、スチレン及び多官能性モノマー[ジビニルベンゼン、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリビニルベンゼン及びトリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート等]を必須構成単量体となる合成高分子を含有するものが好ましい。この場合の多官能モノマーの含有量(重量%)は、基材の重量に基づいて、0.1以上が好ましく、さらに好ましくは0.5以上、特に好ましくは1以上である。また40以下が好ましく、さらに好ましくは20以下、特に好ましくは10以下である。

【0051】本発明のポリペプチド含有基材は、官能基(A)及び/又は構造(B)を有する基材にポリペプチド(P)を配することにより(例えばコーティングにより)、基材に(P)を配した後官能基(A)及び/又は

構造(B)を有する化合物を配することにより(例えばコーティングにより)、又は、基材に官能基(A)及び/又は構造(B)を有する化合物と(P)を同時に配することにより製造することができる。

【0052】ポリペプチド(P)を基材(の表面)に配する方法としては、例えば、ポリペプチド(P)を溶媒に溶かした溶液又は分散させた分散液を予め作製し、これと基材を接触させた後、乾燥する方法等が適用できる。

【0053】ポリペプチド(P)の溶液又は分散液を作製するために用いられる溶媒としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、アミノ酸、ビタミン、アルコール、脂質・糖、酸及び/又は塩基を含有する水溶液及び水等が使用できる。

【0054】無機塩としては、ハロゲン化金属塩、硫酸金属塩、リン酸金属塩、硝酸金属塩、炭酸金属塩及び過ハロゲン酸金属等が使用でき、例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、塩化リチウム、臭化ナトリウム、臭化リチウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅、硫酸鉄、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、硝酸鉄、炭酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム及び過塩素酸リチウム等が挙げられる。有機酸塩としては、炭素数1~4の有機酸金属塩等が使用でき、例えば、蟻酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム及び酒石酸ナトリウム等が挙げられる。

【0055】アミノ酸としては、天然アミノ酸等が使用でき、例えば、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、セリン及びグリシン等が挙げられる。ビタミンとしては、例えば、コリン、イノシトール、ニコチンアミド、グルタミン、ビタミンA及びビタミンB<sub>2</sub>等が挙げられる。アルコールとしては、炭素数1~4のアルコール等が使用でき、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及びブタノール等が挙げられる。

【0056】脂質・糖としては、天然糖等が使用でき、例えば、脂質、単糖、2糖、オリゴ糖、アミノ糖及び酸性糖等が挙げられる。酸としては、無機酸及び炭素数1~6の有機酸等が使用でき、例えば、塩酸、硝酸、硫酸、磷酸、酢酸、蟻酸、酒石酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、フェノール及びカテコール等が挙げられる。塩基としては、無機塩基及び炭素数2~6の有機塩基等が使用でき、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、アンモニア、モノエタノールアミン、トリエタノールアミン及びトリエチルアミン等が挙げられる。

【0057】水としては、蒸留水、イオン交換水、水道水及びイオン交換蒸留水等が挙げられる。これらの溶媒

の中で、無機塩、酸及び/又は塩基を含有する水溶液並びに水が好ましく、さらに好ましくは無機塩を含有する水溶液及び水、特に好ましくは無機塩を含有する水溶液である。なお、これらの含有量(重量%)としては、水溶液又は分散液の重量に基づいて、0.1以上が好ましく、さらに好ましくは1以上である。また50以下が好ましく、さらに好ましくは30以下である。

【0058】ポリペプチド(P)の溶液又は分散液中の(P)の濃度は、溶媒1ml当り、0.01 $\mu$ g以上が好ましく、さらに好ましくは0.1 $\mu$ g以上、特に好ましくは1 $\mu$ g以上である。また100mg以下が好ましく、さらに好ましくは10mg以下、特に好ましくは1mg以下である。ペプチド(P)の溶液又は分散液と基材との接触は、溶液又は分散液を基材に振りかける方法、溶液又は分散液に基材を浸漬する方法等のいずれでもよい。

【0059】接触時間としては、用いる基材によっても異なるが、30秒以上が好ましく、さらに好ましくは1分以上、特に好ましくは3分以上である。また48時間以下が好ましく、さらに好ましくは24時間以下、特に好ましくは12時間以下である。必要に応じて行われる乾燥の条件についても特に制限はなく、通常の方法が適用でき、例えば、必要に応じて順風乾燥機や減圧乾燥機などを用いて、0~200℃、0.001Pa~大気圧の圧力下で、1~100時間乾燥することで行える。

【0060】また、必要に応じて行われる乾燥の前又は後で、無機塩を含有する水溶液又は水で通常の方法で洗浄することもできる。また、接触の後で、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法は特に制限は無く、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌等が挙げられる。

【0061】官能基(A)及び/又は構造(B)を基材に配する方法としては、①ビニル樹脂を主成分とする基材の場合、(A)及び/又は(B)を有するモノマーを、ビニル樹脂を主成分とする基材を作成する時に共重合する方法、②(A)及び/又は(B)を有する反応性化合物を基材に共有結合させる方法、③(A)及び/又は(B)を有する化合物を基材の表面に接触させる方法、④(A)及び/又は(B)を有する化合物を基材を作製する時に基材を構成する材料に混合する方法等が挙げられる。

【0062】なお、(A)及び/又は(B)は、基材表面又はポリペプチド(P)等に化学結合していても、(A)及び/又は(B)を有する化合物として基材表面又は(P)等に物理吸着しててもよい。糖が化学結合する場合、糖の1,3,4位のいずれかで化学結合させること、ステロイドが化学結合する場合、ステロイドの3,7,14位のいずれかで結合させることができる。

【0063】①の方法において、官能基(A)及び/又は構造(B)を有するモノマーとしては、2級アミノ基

(A1)を有するモノマー (ma1)、3級アミノ基 (A2)を有するモノマー (ma2)、アンモニオ基 (A3)を有するモノマー (ma3)、ホスファチジル基 (A4)を有するモノマー (ma4)、リゾホスファチジル基 (A5)を有するモノマー (ma5)、糖 (B1)を有するモノマー (mb1)、ステロイド環 (B2)を有するモノマー (mb2)及びこれらの2種以上の混合物等が使用できる。

【0064】2級アミノ基 (A1)を有するモノマー (ma1)としては、2級アミノ基含有(メタ)アクリレート [N-メチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-エチルアミノプロピル(メタ)アクリレート、N-プロピルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-ベンジルアミノエチル(メタ)アクリレート及びピペリジノエチル(メタ)アクリレート等]、2級アミノ基含有(メタ)アクリルアミド [N-メチルアミノエチル(メタ)アクリルアミド、N-エチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド、N-プロピルアミノエチル(メタ)アクリルアミド及びN-ベンジルアミノエチル(メタ)アクリルアミド等]、2級アミノ基含有芳香族ビニル炭化水素 (N-メチルアミノスチレン、N-プロピルアミノスチレン及びN-ベンジルアミノスチレン等)及び2級アミノ基含有アリルエーテル (N-メチルアミノエチルアリルエーテル及びN-エチルアミノエチルアリルエーテル等)等が挙げられる。

【0065】3級アミノ基 (A2)を有するモノマー (ma2)としては、3級アミノ基含有(メタ)アクリレート [N, N-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N, N-ジエチルアミノプロピル(メタ)アクリレート、N, N-ジプロピルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-ベンジル-N-メチルアミノエチル(メタ)アクリレート、モルホリノエチル(メタ)アクリレート及びN-メチルピペチジノエチル(メタ)アクリレート等]、3級アミノ基含有(メタ)アクリルアミド [N, N-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリルアミド、N, N-ジエチルアミノプロピル(メタ)アクリルアミド、N, N-ジプロピルアミノエチル(メタ)アクリルアミド、N-ベンジル-N-メチルアミノエチル(メタ)アクリルアミド、モルホリノエチル(メタ)アクリルアミド及びN-メチルピペチジノエチル(メタ)アクリルアミド等]、3級アミノ基含有芳香族ビニル炭化水素 (N, N-ジメチルアミノスチレン、N, N-ジプロピルアミノスチレン及びN-ベンジル-N-メチルアミノスチレン等)及び3級アミノ基含有アリルエーテル (N, N-ジメチルアミノエチルアリルエーテル及びN, N-ジエチルアミノエチルアリルエーテル等)等が挙げられる。

【0066】アンモニオ基 (A3)を有するモノマー (ma3)としては、アンモニオ基含有(メタ)アクリレート [(メタ)アクリロイルオキシエチルアンモニウ

ム・クロリド、メチル(メタ)アクリロイルオキシエチルアンモニウム・クロリド、ジメチル(メタ)アクリロイルオキシエチルアンモニウム・クロリド、トリメチル(メタ)アクリロイルオキシエチルアンモニウム・クロリド及びジエチルメチル(メタ)アクリロイルオキシエチルアンモニウム・クロリド等]、アンモニオ基含有(メタ)アクリルアミド [(メタ)アクリロイルアミノエチルアンモニウム・クロリド、メチル(メタ)アクリロイルアミノエチルアンモニウム・クロリド、ジメチル(メタ)アクリロイルアミノエチルアンモニウム・クロリド、トリメチル(メタ)アクリロイルアミノエチルアンモニウム・クロリド及びジエチルメチル(メタ)アクリロイルアミノエチルアンモニウム・クロリド等]、アンモニオ基含有芳香族ビニル炭化水素 (トリメチルビニルフェニルアンモニウム・クロリド等)及びアンモニオ基含有アリルエーテル (トリエチルアリルオキシエチルアンモニウム・クロリド等)等が挙げられる。

【0067】ホスファチジル基 (A4)を有するモノマー (ma4)としては、ホスファチジル基含有(メタ)アクリレート [ホスファチジルエチル(メタ)アクリレート、ジパルミトイルホスファチジルエチル(メタ)アクリレート及びジアラキドノイルホスファチジルプロピル(メタ)アクリレート等]、ホスファチジル基含有(メタ)アクリルアミド [ホスファチジルエチル(メタ)アクリレート、ジパルミトイルホスファチジルエチル(メタ)アクリレート及びジアラキドノイルホスファチジルプロピル(メタ)アクリレート等]、ホスファチジル基含有芳香族ビニル炭化水素 (ジパルミトイルホスファチジルスチレン等)及びホスファチジル基含有アリルエーテル (ジパルミトイルホスファチジルエチルアリルエーテル等)等が挙げられる。

【0068】リゾホスファチジル基 (A5)を有するモノマー (ma4)としては、リゾホスファチジル基含有(メタ)アクリレート [パルミトイルリゾホスファチジルエチル(メタ)アクリレート及びアラキドノイルリゾホスファチジルプロピル(メタ)アクリレート等]、リゾホスファチジル基含有(メタ)アクリルアミド [パルミトイルリゾホスファチジルエチル(メタ)アクリレート及びアラキドノイルリゾホスファチジルプロピル(メタ)アクリレート等]、リゾホスファチジル基含有芳香族ビニル炭化水素 (パルミトイルリゾホスファチジルスチレン等)及びリゾホスファチジル基含有アリルエーテル (パルミトイルリゾホスファチジルエチルアリルエーテル等)等が挙げられる。糖 (B1)を有するモノマー (mb1)としては、糖含有芳香族ビニル炭化水素 (N-p-ビニルベンジルラクトノアミド等)及び糖含有(メタ)アクリレート [グルコース-6-(メタ)アクリレート等]等が挙げられる。

【0069】ステロイド環 (B2)を有するモノマー



(mb2)としては、ステロイド環含有(メタ)アクリレート[コレステロール(メタ)アクリレート及びエルゴステロール(メタ)アクリレート等]が挙げられる。これらのモノマーを用いて共重合する方法としては、ビニル樹脂を構成するモノマーにこれらを配合して、通常の方法(バルク重合、懸濁重合等)で共重合させる方法等が挙げられる。共重合させるときのこれらモノマーの含有量(重量%)は、構成モノマーの全重量に基づいて、0.001以上が好ましく、さらに好ましくは0.1以上である。また、30以下が好ましく、さらに好ましくは20以下である。

【0070】②の方法において、官能基(A)及び/又は構造(B)を有する反応性化合物としては、2級アミノ基(A1)を有する反応性化合物、3級アミノ基(A2)を有する反応性化合物、アンモニオ基(A3)を有する反応性化合物、ホスファチル基(A4)を有する反応性化合物、リゾホスファチル基(A5)を有する反応性化合物、糖(B1)を有する反応性化合物、ステロイド環(B2)を有する反応性化合物及びこれらの2種以上の混合物等が使用できる。2級アミノ基(A1)を有する反応性化合物としては、上記の(A1)を有するモノマーのほか、炭素数3~5の2級アミノ基含有ハロゲン炭化水素(メチルアミノエチルクロリド及びメチルアミノプロピルクロリド等)、炭素数4~8の2級アミノ基含有エポキシド(メチルアミノプロピルエポキシド、メチルアミノブチルエポキシド及びメチルアミノエチルグリシジルエーテル等)等が挙げられる。

【0071】3級アミノ基(A2)を有する反応性化合物としては、上記の(A2)を有するモノマーのほか、炭素数4~6の3級アミノ基含有ハロゲン炭化水素(ジメチルアミノエチルクロリド及びジエチルアミノエチルクロリド等)、炭素数5~8の3級アミノ基含有エポキシド(ジメチルアミノプロピルエポキシド、ジメチルアミノエチルグリシジルエーテル等)等が挙げられる。

【0072】アンモニオ基(A3)を有する反応性化合物としては、上記の(A3)を有するモノマーのほか、炭素数5~8のアンモニオ基含有ハロゲン炭化水素(トリメチルクロロエチルアンモニウムクロリド等)、炭素数6~10のアンモニオ基含有エポキシド(トリメチルグリシジルエチルアンモニウムクロリド等)等が挙げられる。

【0073】ホスファチル基(A4)を有する反応性化合物としては、上記の(A4)を有するモノマーのほか、炭素数2~6のホスファチル基含有ハロゲン炭化水素(ホスファチルエチルクロリド及びジミリスチルホスファチルエチルクロリド等)、炭素数3~8のホスファチル基含有エポキシド(ホスファチルエチルグリシジルエーテル及びジミリスチルホスファチルエチルグリシジルエーテル等)等が挙げられる。

【0074】リゾホスファチル基(A5)を有する反

応性化合物としては、上記の(A5)を有するモノマーのほか、炭素数2~6のリゾホスファチル基含有ハロゲン炭化水素(ミリスチルリゾホスファチルエチルクロリド等)、炭素数3~8のリゾホスファチル基含有エポキシド(ミリスチルリゾホスファチルエチルグリシジルエーテル等)等が挙げられる。

【0075】糖(B1)を有する反応性化合物としては、上記の(B1)を有するモノマーのほか、炭素数6~18の糖含有ハロゲン炭化水素(グルコース-6-エチルクロリド等)、炭素数6~18の糖含有エポキシド(グルコース-6-グリシジルエーテル等)等が挙げられる。

【0076】ステロイド環(B2)を有する反応性化合物としては、上記の(B2)を有するモノマーのほか、炭素数17~32のステロイド環含有ハロゲン化合物(クロロエチルコレステロール等)、炭素数17~32のステロイド環含有エポキシド(グリシジルコレステロール等)等が挙げられる。

【0077】基材とこれらの反応性化合物を共有結合させるとき、上記のモノマーを用いる場合は、パーオキシド(過塩素酸ナトリウム、ジブチルパーオキシド、ジクミルパーオキシド、クメンハイドロパーオキシド等)とともに、基材とこれらの反応性化合物(水懸濁液としてもよい)を窒素雰囲気下、50~120℃で1~48時間反応させる方法を適用してもよい。

【0078】また、ハロゲン炭化水素又はエポキシドを用いる場合、塩基(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエチルアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセン-7(登録商標:DBU)等)とともに、基材とこれらのハロゲン炭化水素又はエポキシド(水懸濁液としてもよい)を、20~90℃で1~48時間反応させる方法を適用してもよい。反応性化合物の使用量(g/cm<sup>2</sup>)は、基材の表面積1cm<sup>2</sup>当り、1×10<sup>-4</sup>以上が好ましく、さらに好ましくは1×10<sup>-3</sup>以上である。また1以下が好ましく、さらに好ましくは1×10<sup>-2</sup>以下である。

【0079】③の方法において、官能基(A)及び/又は構造(B)を有する化合物としては、2級アミノ基(A1)を有する化合物、3級アミノ基(A2)を有する化合物、アンモニオ基(A3)を有する化合物、ホスファチル基(A4)を有する化合物、リゾホスファチル基(A5)を有する化合物、糖(B1)を有する化合物、ステロイド環(B2)を有する化合物及びこれらの2種以上の混合物等が使用できる。

【0080】2級アミノ基(A1)を有する化合物としては、上記の(A1)を有するモノマーからなる(共)重合体のほか、重量平均分子量(以下Mwと略する)500~1,000,000の2級アミノ基含有ポリマー(例えば、ポリエチレンイミン、ジシアンジアミド・ホルマリン縮合物、ジシアンジアミド・ジエチレントリア

ミン重縮合物、ジシアンジアミド・ジエチレントリアミン・尿素重縮合物及びジアリアルアミン塩・二酸化硫黄共重合物等) 等が挙げられる。なお、 $M_w$ は、ポリエチレングリコールを基準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより測定されるものである。

【0081】3級アミノ基(A2)を有する化合物としては、上記の(A2)を有するモノマーからなる(共)重合体のほか、 $M_w 500 \sim 1,000,000$ の3級アミノ基含有ポリマー(ジシアンジアミド・ジエチレントリアミン重縮合物、ジシアンジアミド・ジエチレントリアミン・尿素重縮合物、ポリヒスチジン及びポリ(N-メチルエチレンイミン)等)等が挙げられる。

【0082】アンモニオ基(A3)を有する化合物としては、上記の(A3)を有するモノマーからなる(共)重合体のほか、 $M_w 500 \sim 1,000,000$ のアンモニオ基含有ポリマー(ポリエチレンイミンのメチルクロリド4級化物、ジシアンジアミド・ホルマリン縮合物、エピクロロヒドリン・ジメチルアミン付加重合物、ジメチルジアルリルアンモニウムクロリド・二酸化硫黄共重合物、ジメチルジアルリルアンモニウムクロリド重合物等)等が挙げられる。

【0083】ホスファチジル基（A4）を有する化合物としては、上記の（A4）を有するモノマーからなる

(共)重合体のほか、ホスファチジル基含有化合物(ホスファチジン酸(鶏卵黄身由来のホスファチジン酸ナトリウム、 $\beta$ -アラキドノイル- $\gamma$ -ステアロイルホスファチジン酸ナトリウム、ホスファチジン酸、ジラウロイルホスファチジン酸、ジオレイルホスファチジン酸、ジラウロイルホスファチジン酸ナトリウム及びジオレイルホスファチジン酸ナトリウム等)、ホスファチジルコリン(鶏卵黄身由来ホスファチジルコリンの水素添加物、 $\beta$ -アセチル- $\gamma$ -ヘキサデシルホスファチジルコリン、ジアラキドイルホスファチジルコリン、ジイノレイルホスファチジルコリン、ジトランス-2, トランス-4-オクタデカジエノイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、 $\beta$ -メチル- $\gamma$ -ヘキサデシルホスファチジルコリン及び $\beta$ -オレイル- $\gamma$ -パルミトイルホスファチジルコリン等)、ホスファチジルエタノールアミン(ウシ脳由来のI型ホスファチジルエタノールアミン、大腸菌由来のV型ホスファチジルエタノールアミン、鶏卵黄身由来のホスファチジルエタノールアミン、大豆由来のホスファチジルエタノールアミン及びジミリストイルホスファチジルエタノールアミン等)、ホスファチジルグリセロール(ホスファチジルグリセロールナトリウム、ホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミンナトリウム及びウシ心臓由来のカルジオリピン?ナトリウム等)、ホスファチジルセリン(ジパルミトイルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホスファチジルセリンナトリウム及びウシ脳由来のホスファチジルセ

リンナトリウム等)、ホスファチジルイノシトール(小麦由来のホスファチジルイノシトールナトリウム等)及びスフィンゴミエリン<sup>®</sup>等が挙げられる。

【0084】リゾホスファチジル基(A5)を有する化合物としては、上記の(A5)を有するモノマーからなる(共)重合体のほか、リゾホスファチジル基含有化合物(リゾホスファチジン酸(オレイルリゾホスファチジン酸ナトリウム及びステアリルリゾホスファチジン酸等)、リゾホスファチジルコリン(鶏卵黄身由来のリゾホスファチジルコリン、デカノイルリゾホスファチジルコリン及びステアロイルリゾホスファチジルコリン等)、リゾホスファチジルセリン(ウシ脳由来のリゾホスファチジルセリン2ナトリウム等)及びリゾホスファチジルイノシトール(大豆由来のリゾホスファチジルイノシトールナトリウム等)等)等が挙げられる。

【0085】糖（B1）を有する化合物としては、上記の（B1）を有するモノマーからなる（共）重合体のほか、糖含有化合物（糖脂質（アシアロガングリオシド、ガングリオシド、シアリルルイス、シアリルラクトテトラオシルセラミド、シアリルネオラクトテトラオシルセラミド、ガラクロシルセラミド、グロボテトラシルセラミド、グルコセレブロシド、グルコシルセラミ及びラクロシルセラミド等）、単糖類（ガラクトース、グルコース、マンノース、フコース、グルコサミン、ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-メチルグルコサミン、N-アセチルニューラミン酸、アラビノース、デオキシグルコース、デオキシフルオログルコース、リボース、デオキシリボース、エリスロース、フルクトース、イノシトール、リクソース、マドウロース、ムラミン酸、デオキシマンオース、ソルボース、キシロース及びトリアセチルグルカル等）、多糖類（セロビオース、ジフルクトース、コジビオース、ラクトース、ラクツロース、マルチトール、マルトース、トレハロース、ガラクトシラクトース、グルコシルスクロース、イソマルトオリゴサッカライド、マルトオリゴサッカライド、テハロサミン、パノース、キシロオリゴサッカロース、フルクトオリゴサッカライド、ニストース、スタキロース、キトオリゴ糖、キトサンオリゴ糖、ムコ多糖、アルギニン酸、カードラン、デキストラン、レバン、パラミオール、ポリデキストロース、プルラン、スターチ及びシクロデキストリン等））等が挙げられる。

【0086】ステロイド環（B2）を有する化合物としては、上記の（B2）を有するモノマーからなる（共）重合体のほか、ステロイド環含有化合物（天然又は合成の胆汁酸（ケノジオール、コール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、グリコリトコール酸、リソコール酸、スクアレン及びタウロコール酸等）及び天然又は合成のステロール（ブラシカステロール、カンベステロール、コレステロール、エルゴステロール、フコステロール、ラノステロール、シトステロール及びスチグマステ



ロール等)等が挙げられる。

【0087】基材にこれらの化合物を接触させる方法としては、前記、ポリペプチド(P)を基材に接触させる方法と同様の方法が適用できる。これらの化合物の使用量( $\text{g}/\text{cm}^2$ )は、基材の表面積 $1\text{cm}^2$ 当り、 $1\times 10^{-5}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $1\times 10^{-6}$ 以上である。また1以下が好ましく、さらに好ましくは $1\times 10^{-7}$ 以下である。

【0088】④の方法において、官能基(A)及び/又は構造(B)を有する化合物としては、③の方法で用いることができる化合物と同じものが使用できる。官能基(A)及び/又は構造(B)を有する化合物を基材中に混合する方法としては、基材を構成する素材と(A)及び/又は(B)を有する化合物とを混合した後に成型する方法や、基材がビニル樹脂の場合、(A)及び/又は(B)を有する化合物の存在下にビニル樹脂を構成するモノマーを公知の方法で重合させる方法等が挙げられる。これら化合物の使用量( $\text{g}/\text{cm}^2$ )は、基材の表面積 $1\text{cm}^2$ 当り、 $1\times 10^{-5}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $1\times 10^{-6}$ 以上である。また1以下が好ましく、さらに好ましくは $1\times 10^{-7}$ 以下である。

【0089】本発明のポリペプチド含有基材は、細胞培養用に好適に使用されるほか、火傷などの治療に用いられる創傷被覆剤や、体内埋め込み型の組織再生用材料として使用できるものである。本発明のポリペプチド含有基材を用いて、培養される動物細胞の種類としては特に制限がなく、ヒト、サル、マウス、ハムスター、ラット、イヌ及び昆虫等の初代培養細胞や株化細胞、並びに細胞培養実験、医薬品又はワクチン生産等に用いられる公知の細胞等が使用できる。

【0090】具体的には例えば、Vero(アフリカミドリザル腎)細胞、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞、MDCK(イヌ腎)細胞、WI38(ヒト胎児肺)細胞、ヒト由来の幹細胞、内皮細胞、上皮細胞、実質細胞、線維芽細胞及び角質細胞等の正常細胞等が挙げられる。これら細胞の中では、無血清培養のニーズが高く、本発明のポリペプチド含有基材の特徴が最大限活用される医薬品やワクチン生産用に用いられる細胞(Vero細胞、MDCK細胞、CHO細胞及び正常細胞等)に最適である。

【0091】本発明の基材を用いて動物細胞を培養する方法としては特に制限はなく、通常の方法、例えば、朝倉書店発行日本組織培養学会編「組織培養の技術」に記載されている方法等が適用できる。例えば、基材としてT-フラスコ(培養面積： $10\sim 500\text{cm}^2$ 等)、プレート( $2\sim 384$ 穴等)又はディッシュ(培養面積： $5\sim 500\text{cm}^2$ 等)を用いる場合、未成熟肥満細胞を $50\sim 500$ 万個/mLの濃度で分散した培地を、深さが $1\sim 20\text{mm}$ になる量だけディッシュ又はシャーレに加え、 $\text{CO}_2$ 濃度5体積%、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガスインキュ

ベーター中で静置培養する方法等が挙げられる。この際、 $1\sim 5$ 日毎に、 $1/3$ 量～全量の培地を交換することが好ましい。

【0092】基材としてローラーボトル(容量： $0.1\sim 10\text{L}$ 等)を用いる場合、未成熟肥満細胞を $50\sim 500$ 万個/mLの濃度で分散した培地を、 $0.5/100\sim 30/100$ の容量になる量だけローラーボトルに加え、 $\text{CO}_2$ 濃度5体積%、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガスインキュベーター中で、 $0.1\sim 10\text{rpm}$ の回転速度で回転させながら培養する方法等が挙げられる。この際、 $12\sim 5$ 日毎に、 $1/3$ 量～全量の培地を交換することが好ましい。

【0093】基材としてマイクロキャリアビーズ(粒子径： $20\sim 500\mu\text{m}$ 、密度： $1.0\sim 1.1\text{g}/\text{cm}^3$ 、表面積： $100\sim 100,000\text{cm}^2/\text{g}$ 等)を用いる場合、スピナーフラスコ(容量： $10\sim 500\text{mL}$ 等)中に、未成熟肥満細胞を $50\sim 500$ 万個/mLの濃度で分散した培地を、 $1/10\sim 7/10$ の容量になる量だけに加え、マイクロキャリアビーズを、培地 $1\text{L}$ 当り $0.1\sim 50\text{g}$ の割合で加え、 $\text{CO}_2$ 濃度5体積%、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガスインキュベーター中で、 $1\sim 100\text{rpm}$ の回転速度で攪拌しながら培養する方法等が挙げられる。この際、 $12\sim 5$ 日毎に、 $1/3$ 量～全量の培地を交換することが好ましい。さらにスピナーフラスコの代わりに流動層型バイオリアクターや充填型バイオリアクター(容量： $10\text{mL}\sim 10\text{kL}$ 等)を用いて、マイクロキャリアビーズをバイオリアクター内にセットし未成熟肥満細胞を $50\sim 500$ 万個/mLの濃度で分散した $1\sim 5$ 倍容量の培地を循環させた後、 $\text{CO}_2$ 濃度5体積%、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガスインキュベーター中で調整した培地を $1\sim 100\text{cm}/\text{分}$ の線速度で循環しながら連続培養する方法等が挙げられる。

【0094】基材としてホローファイバー(内径 $10\sim 500\mu\text{m}$ 等)を用いる場合、カートリッジ(容量： $10\sim 1000\text{mL}$ 等)中に、未成熟肥満細胞を $50\sim 500$ 万個/mLの濃度で分散した培地をカートリッジに加えたあと、ホローファイバー内に、 $\text{CO}_2$ 濃度5体積%、 $37^\circ\text{C}$ の炭酸ガスインキュベーター中で調整した培地を $1\sim 100\text{cm}/\text{分}$ の線速度で循環し連続培養する方法等が挙げられる。

【0095】培養後は、EDTA等のキレート剤若しくはトリプシン等の蛋白質分解酵素で処理するか又はスクレーパーで掻きとることによって、成熟肥満細胞が回収される。これらのうち、EDTAで処理する方法が好ましい。

【0096】培地としては、用いる動物細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DME培地、 $\alpha$ MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地及びRPMI培地等、朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の

技術第三版」581頁に記載の基礎培地、これらの培地に血清成分（ウシ胎児血清等）等を添加したもの、並びに市販の無血清培地【味の素（株）製無血清培地ASF103、同ASF104、同ASF301、ギブコ社製無血清培地CHO-SFM、同VP-SFM等】等が用いられる。

【0097】血清培地を使用した場合、血清中に成分未知の蛋白質等が含まれ再現性が得られにくいこと、細胞を用いる医薬品生産の場合には精製工程が複雑となりコストがかかること、さらにウィルス感染の危険性があること等の理由から、血清を含まないいわゆる無血清培地が好ましく、特に、本発明の基材は、無血清培地でも細胞の接着・増殖性に優れているため、本発明の基材とともに用いる培地としては無血清培地が特に好ましい。

【0098】さらに必要に応じて、細胞増殖因子（S）を培地中に含有させることにより、動物細胞の増殖速度をさらに高めたり、細胞活性を高めたり、細胞が本来有する機能を発現させたりすることができる。細胞増殖因子（S）は細胞を増殖させる活性のある物質であり、例えば、FGF、VEGF、HGF、EGF、PDGF、IGF及びBMP等が挙げられ、この他に、例えば財団法人名古屋大学出版会発行「上田実編ティッシュエンジニアリング（1999年）」43～51頁及び同文献に付記されている参考文献に記載されているもの等も用いられる。

#### 【0099】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

＜実施例1＞スチレン99重量部、ジビニルベンゼン1重量部を懸濁重合して得られたポリスチレンビーズを金属製網篩（JIS Z8801-2000）で篩い分けして、75～106 $\mu$ mの間の粒子径を有するビーズを得た。レーザー式粒度分布測定装置LA-920（堀場製作所製）で測定した体積平均粒径は、96 $\mu$ mであった。このビーズの平均表面積は、595 $\text{cm}^2/\text{g}$ と計算された。

【0100】特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）、配列（10）とArg Gly Asp配列との繰り返し単位からなるポリペプチドを、遺伝子組み替え大腸菌を増殖させ、破碎し、抽出することにより作成し、（Mn）の違いによって精製し、以下のポリペプチドを単離した。

【0101】ポリペプチド（F1）；（Mn）80,000、1分子あたりのRGD配列の数10個、（GAGAGS）、配列の数10個。

ポリペプチド（F2）；（Mn）240,000、1分子あたりのRGD配列の数30個、（GAGAGS）、配列の数30個。

ポリペプチド（F3）；（Mn）50,000、1分子

あたりのRGD配列の数6個、（GAGAGS）、配列の数6個。

ポリペプチド（F4）；（Mn）500,000、1分子あたりのRGD配列の数60個、（GAGAGS）、配列の数60個。

【0102】次いで、ポリペプチド（F1）の4.5規定の過塩素酸リチウム溶液（ポリペプチドの濃度；1 $\text{mg}/\text{ml}$ ）をリン酸バッファー液（PBS）でポリペプチド（F1）の濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈し、ポリペプチド（F1）溶液（1）を作製した。

【0103】10 $\text{ml}$ 試験管にジメチルアミノエチルメタクリレート2 $\text{g}$ 、アゾビスイソヴァレロニトリル0.04 $\text{g}$ およびジオキサン2 $\text{g}$ を加え、窒素置換後、密閉下、70℃湯浴中で4時間振盪した。得られた溶液をヘキサン100 $\text{mL}$ 中に滴下し、析出したポリマー分を回収し乾燥することによりジメチルアミノエチルメタクリレート重合体（PDAM）を得た。次いで、PDAMをイオン交換水に溶解し、PDAMの濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPDAM溶液を作製した。

【0104】ポリペプチド溶液（1）37 $\text{ml}$ 及びPDAM溶液37 $\text{ml}$ の混合物に上記で得られたビーズ5 $\text{g}$ を加え、ポリフッ化エチレン製攪拌子で12時間、20～30℃の温度下で攪拌した。得られたビーズスラリーを振盪器上にセットしたステンレス製バットに移し、100℃の熱風を吹きつけながら、24時間振盪乾燥した。得られた乾燥ビーズをPBS50 $\text{ml}$ で2回洗浄し、PBS中で121℃で20分間オートクレーブ滅菌後、UV照射下に乾燥することにより、本発明のポリペプチド含有基材1を得た。

【0105】ポリペプチド含有基材1を4.5規定の過塩素酸リチウム溶液中で24時間、37℃で攪拌後、過塩素酸リチウム溶液上清中に溶出したポリペプチド（F1）の含有量をピアスケミカル社製BCA蛋白試薬で測定することによって、ポリペプチド含有基材1のポリペプチド（F1）含有量を求めた結果、1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

【0106】ポリペプチド含有基材11 $\text{g}$ をイオン交換水50 $\text{ml}$ に分散し、を1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、ポリペプチド含有基材1の表面に存在するジメチルアミノ基の量を求めた結果、5 $\times 10^{15}$ 個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0107】＜実施例2＞PDAM溶液の代わりに、ジシアンジアミド・ジエチレントリアミン・尿素重縮合物（商品名：サンフィックス414、三洋化成工業株式会社製）を用い、固形分を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・溶液とする以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材2を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材2のポリペプチド（F1）含有量は1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、また1/100規定塩酸溶液で電位差滴定して得られた2級及び3級アミンの量は1 $\times 1$

10

20

30

40

50

0<sup>6</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0108】＜実施例3＞PDAM溶液の代わりに、ジパルミトイルホスファチジルグリセロールの100μg/ml水溶液を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材3を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材3のポリペプチド

(F1)含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また、カイノス社製リン脂質測定キット「アクアオート カイノス PL試薬」を用いて測定したホスファチジル基の量は、1×10<sup>16</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0109】＜実施例4＞PDAM溶液の代わりに、コール酸の100μg/ml水溶液を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材4を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材4のポリペプチド(F1)含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また、ロッシュダイアグノスティックス社製F-キット(ステロイド用)を用いて測定したステロイド環の量は、4×10<sup>16</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0110】＜実施例5＞ポリペプチド(F1)の代わりに、ポリペプチド(F2)を用いる以外は実施例1と同様にして本発明のポリペプチド含有基材5を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材5のポリペプチド(F2)含有量は1.0μg/cm<sup>2</sup>であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、2×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0111】＜実施例6＞ポリペプチド(F1)の代わりに、ポリペプチド(F3)を用いる以外は実施例1と同様にして本発明のポリペプチド含有基材6を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材6のポリペプチド(F3)含有量は0.9μg/cm<sup>2</sup>であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、2×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0112】＜実施例7＞ポリペプチド(F1)の代わりに、ポリペプチド(F4)を用いる以外は実施例1と同様にして本発明のポリペプチド含有基材7を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材7のポリペプチド(F4)含有量は1.2μg/cm<sup>2</sup>であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、4×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0113】＜実施例8＞特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、(Gly AlaGly Ala Gly Ser)<sub>n</sub>配列(10)とIle Lys Val Ala Val配列

(7)とを7個含む(Mn)約9万の遺伝子組換え大腸菌の産生蛋白質ポリペプチドLを作成した。ポリペプチド(F1)の代わりに、このポリペプチドLを用いる以外は実施例1と同様にして本発明のポリペプチド含有基材8を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド

含有基材8のポリペプチドLの含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、3×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0114】＜実施例9＞PDAMの代わりに、和光純薬(株)製ポリエチレンイミン(分子量=70,000)を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材9を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材9のポリペプチド(F1)含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また1/100規定塩酸溶液で電位差滴定して得られた2級アミンの量は4×10<sup>16</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0115】＜実施例10＞PDAM溶液の代わりに、PDAM溶液100mLにメチルクロリド5gを加え、80℃で8時間反応させて得られた溶液を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材10を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材10のポリペプチド(F1)含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また1/100規定塩酸溶液で電位差滴定して得られた4級アンモニウム塩の量は2×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0116】＜実施例11＞PDAMの代わりに、和光純薬工業(株)製ガングリオシドG ボビンプレインを用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材11を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材11のポリペプチド(F1)含有量は1.1μg/cm<sup>2</sup>であり、また、ロッシュダイアグノスティックス社製「F-キット 糖質用」を用いて得られた糖の量は1×10<sup>16</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0117】＜実施例12＞ポリペプチド溶液(1)の代わりに、ポリペプチド(F1)の濃度が45μg/mlのポリペプチド溶液(2)を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材12を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材12のポリペプチド(F1)含有量は0.3μg/cm<sup>2</sup>であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、2×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0118】＜実施例13＞ポリペプチド溶液(1)の代わりに、ポリペプチド(F1)の濃度が1000μg/mlのポリペプチド溶液(3)を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材13を得た。実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材13のポリペプチド(F1)含有量は10.0μg/cm<sup>2</sup>であり、また、N/100硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、3×10<sup>15</sup> 個/cm<sup>2</sup>であった。

【0119】＜実施例14＞ステレン98重量部、ジビニルベンゼン1重量部、ジメチルアミノエチルメタクリレート1重量部を懸濁重合して得られたポリステレンビ

10

20

30

40

50

ーズを金属製網篩（JIS 28801-2000）で篩い分けして、75~106  $\mu\text{m}$ の間の粒子径を有するビーズを得た。レーザー式粒度分布測定装置LA-920（堀場製作所製）で測定した体積平均粒径は、93  $\mu\text{m}$ であった。このビーズの平均表面積は、626  $\text{cm}^2/\text{g}$ と計算された。

【0120】ポリペプチド溶液（1）37mlに上記で得られたビーズ5gを加え、ポリフッ化エチレン製攪拌子で12時間、20~30℃の温度下で攪拌した。得られたビーズスラリーを振盪器上にセットしたステンレス製パットに移し、100℃の熱風を吹きつけながら、24時間振盪乾燥した。得られた乾燥ビーズをPBS50mlで2回洗浄し、PBS中で121℃で20分間オートクレーブ滅菌後、UV照射下に乾燥することにより、本発明のポリペプチド含有基材14を得た。

【0121】実施例1と同様にして求めたポリペプチド含有基材14のポリペプチド（F1）含有量は、0.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって測定されたジメチルアミノ基の量は、 $1 \times 10^{17}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0122】＜比較例1＞ポリペプチド溶液（1）の代わりに、PBSを用いる以外は実施例1と同様にして、比較用基材15を得た。実施例1と同様にして求めた比較用基材15のジメチルアミノ基の量は、 $4 \times 10^{15}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0123】＜比較例2＞PDAM溶液の代わりに、PBSを用いる以外は実施例1と同様にして、比較用基材16を得た。実施例1と同様にして求めた比較用基材16のSLPF含有量は、1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

【0124】＜比較例3＞PDAMの代わりに、和光純薬工業（株）製ポリーL-リジンを用いる以外は実施例1と同様にして、比較用基材17を得た。実施例1と同様にして求めた比較用基材17のSLPF含有量は、1.1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、また1級アミノ基の量は、 $1 \times 10^{16}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

10

\* 【0125】＜比較例4＞ポリペプチド溶液（1）の代わりに、PBSを用いる以外は実施例2と同様にして、比較用基材18を得た。実施例2と同様にして求めた比較用基材18の2級及び3級アミンの量は、 $1 \times 10^{16}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0126】＜比較例5＞ポリペプチド溶液（1）の代わりに、PBSを用いる以外は実施例3と同様にして、比較用基材19を得た。実施例3と同様にして求めた比較用基材19のホスファチジル基の量は、 $1 \times 10^{16}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0127】＜比較例6＞ポリペプチド溶液（1）の代わりに、PBSを用いる以外は実施例4と同様にして、比較用基材20を得た。実施例4と同様にして求めた比較用基材20のステロイド環の量は、 $4 \times 10^{15}$  個/ $\text{cm}^2$ であった。

20

【0128】＜細胞培養＞得られた基材1~20を用いて無血清細胞培養実験を行った。20個の1Lスピナーフラスコに基材1~20を6gづつそれぞれ加え、245mlのインビトロジェン社製無血清培地ギブコOptiPro-SFMを加え、37℃で20分間攪拌下温調後、MDCK細胞〔大日本製薬（株）から購入〕を細胞濃度： $5.0 \times 10^6$  個/mLに分散したものを5mlを加え（細胞密度= $10$  万個/mL）、25rpmで攪拌しながら、二酸化炭素と空気の混合物（二酸化炭素/空気=5/95体積比）中、37℃で培養を行なった。基材への初期接着性を評価するため30分後に、また、増殖性を評価するため1日後及び3日後に、攪拌下に基材の懸濁液1mlをそれぞれサンプリングし、PBSで基材を洗浄して基材に接着していない細胞を除去した後、細胞核数をウィーゼル（Wezel）によるクリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法（nuclei-counting method）で計数することで、細胞密度（単位：万個/mL）を測定した。結果を表1に示す。

【0129】

30

\* 【表1】

	実 施 例														比 較 例					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2	3	4	5	6
基材番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
30分後	5	6	4	6	4	4	6	5	6	4	6	5	5	4	3	2	4	3	1	2
1日後	18	19	18	19	18	17	20	18	18	17	19	18	18	17	5	9	12	6	8	7
3日後	75	80	70	78	75	70	78	75	80	70	78	77	72	74	15	40	50	22	32	34

【0130】なお、比較例1の基材15を用い、インビトロジェン社製無血清培地ギブコOptiPro-SFMの代わりに、血清培地（FBS10%含有MEME）を用いた場合の細胞密度（万個/mL）は、30分後：5、1日後：16、3日後：70であった。

【0131】＜実施例1.5＞旭テクノグラス製60mm  $\phi$ 細胞培養ディッシュ（培養面積：28  $\text{cm}^2$ /個）に、実施例1で得られたポリペプチド溶液（1）とPDAM溶液の当重量混合物をPBSで10倍に希釈したも

のを1.5ml加え、20~25℃のクリーンベンチ内で1週間放置することによって、自然乾燥させた。さらにPBS5mlで2回洗浄して、本発明のポリペプチド含有基材（ディッシュ1）を得た。

【0132】ディッシュ1に4.5規定の過塩素酸リチウム溶液3mlを加え、37℃で48時間振盪後、過塩素酸リチウム溶液上清中に溶出したポリペプチド（F1）の含有量をビアスケミカル社製BCA蛋白試薬で測定することによって、ディッシュ1のポリペプチド（F

50

1) 含有量を求めた結果、 $2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。ディッシュ1にイオン交換水1.5ml加え、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、ディッシュ1の表面に存在するジメチルアミノ基の量を求めた結果、 $1 \times 10^{17}$ 個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0133】＜実施例16＞ポリペプチド(F1)の代わりにポリペプチドLを用いる以外は実施例15と同様にして、本発明のポリペプチド含有基材(ディッシュ2)を得た。実施例15と同様にして求めたディッシュ2のポリペプチドL含有量は $2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、また、1/100規定硝酸銀水溶液で電位差滴定することによって、測定されたジメチルアミノ基の量は、 $1 \times 10^{17}$ 個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0134】＜比較例7＞ポリペプチド溶液(1)の代わりに、PBSを用いる以外は実施例15と同様にして、比較用のディッシュ3を得た。実施例15と同様にして求めたディッシュ3のジメチルアミノ基の量は $4 \times 10^{16}$ 個/ $\text{cm}^2$ であった。

【0135】＜細胞培養＞得られたディッシュ1～3を用いて無血清細胞培養実験を行った。各ディッシュに、インビトロジェン社製無血清培地ギブコOptiPro-SFMに、MDCK細胞[大日本製薬(株)から購入]を細胞濃度：2万個/mLに分散したもの5mlを加え(総細胞数：10万個)、二酸化炭素と空気の混合物(二酸化炭素/空気=5/95体積比)中、37℃で3日間培養を行なった。ディッシュをトリプシンで処理\*

<110>三洋化成工業株式会社；SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120>ポリペプチド含有基材

<160>11

<210>1

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Arg Glu Asp Val

1

<210>2

<211>5

<213>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

<210>3

<211>5

<213>PRT

<213>Homo sapiens

<400>3

Pro Asp Ser Gly Arg

1

5

\*し細胞を浮遊させ、血球計数盤を用いて顕微鏡で細胞数(万個)を測定した。その結果を表2に示す。

【0136】

【表2】

	実施例		比較例
	15	16	7
ディッシュ番号	1	2	3
細胞数(万個)	72	78	42

10 【0137】なお、比較例7のディッシュ3を用いて、インビトロジェン社製無血清培地ギブコOptiPro-SFMの代わりに、血清培地(FBS10%含有MEME)を用いた場合の細胞数は、65万個であった。

【0138】以上の実施例及び比較例から、本発明のポリペプチド含有基材を用いた場合、無血清培養においても血清培地を使用した場合と同様以上かつ、ポリペプチド(F1)等単独をコーティングしたものよりも優れた細胞接着性及び細胞増殖性が得られ、細胞を効率的に培養できることが判る。

20 【0139】

【発明の効果】本発明の基材を用いると、無血清でも細胞を効率的に培養が可能であり、動物細胞を用いる医薬品やワクチンの生産の完全無血清化が実現できるものである。

【0140】

【配列表】

29

30

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;7

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;4

Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg

1

5

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;6

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;5

Leu Gly Thr Ile Pro Gly

1

5

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;10

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;6

Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile

1

5

10

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;5

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;7

Ile Lys Val Ala Val

1

5

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;4

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;8

Asp Gly Glu Ala

1

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;6

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Bombyx mori

&lt;400&gt;9

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

1

5

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;54

&lt;213&gt;PRT

&lt;213&gt;Bombyx mori

&lt;400&gt;10

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1

5

10

15

31  
 Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala  
 20 25 30  
 Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser  
 35 40 45  
 Gly Ala Gly Ala Gly Ser  
 50  
 <210>11  
 <211>30  
 <213>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 <400>11  
 Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro  
 20 25 30